# DARSTELLUNG, EIGENSCHAFTEN, PHYSIOLOGIE UND PATHOPHYSIOLOGIE DES KININOGENS (LITERATURÜBERSICHT)

Rosemarie Dieterle

1978

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik der Universität München
Leitung: Prof.Dr. Hans Fritz

---

# DARSTELLUNG, EIGENSCHAFTEN, PHYSIOLOGIE UND PATHOPHYSIOLOGIE DES KININOGENS (LITERATURÜBERSICHT)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
ROSEMARIE DIETERLE
aus Göppingen

München 1978

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr. H. Fritz
Mitberichterstatter:
Dekan: Prof.Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 30.5.1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

INHALTSVERZEICHNIS


| | | Seite |
|---|---|---|
| I. | EINLEITUNG | 1 |
| II. | BIOCHEMIE DES KININOGENS | 4 |
| 1. | Bestimmungsmethoden | 4 |
| 1.1. | Biologische Bestimmung | 4 |
| 1.1.1. | Serumvorbehandlung | 4 |
| 1.1.2. | Kininogenbestimmung mit Trypsin | 5 |
| 1.1.3. | Kininogenbestimmung mit Kallikrein | 7 |
| 1.2. | Immunologische Bestimmung | 8 |
| 2. | Isolierung und biochemische Eigenschaften | 9 |
| 2.1. | Menschliches Kininogen | 9 |
| 2.2. | Rinder-Kininogen | 27 |
| 2.2.1. | LMW-Rinder-Kininogen | 27 |
| 2.2.2. | HMW-Rinder-Kininogen | 33 |
| 2.3. | Pferde-Kininogen | 39 |
| 2.4. | Kaninchen-Kininogen | 39 |
| 2.5. | Andere Kininogene | 40 |
| III. | PHYSIOLOGIE | 41 |
| 1. | Vorkommen | 41 |
| 2. | Physiologische Funktion | 44 |
| 2.1. | Wirkung der Kinine | 44 |
| 2.2. | Muskel- und Hautdurchblutung | 47 |
| 2.3. | Schwangerschaft | 47 |
| 2.4. | Exkretorische Drüsen | 48 |
| 2.5. | Niere | 48 |
| 2.6. | Genitaltrakt | 49 |
| 2.7. | Gerinnung und Fibrinolyse | 50 |
| IV. | PATHOPHYSIOLOGIE | 52 |

Seite


| | | |
|---|---|---|
| 1. | Entzündung und Gewebsschädigung | 52 |
| 2. | Immunologische Erkrankungen | 54 |
| 3. | Schock | 55 |
| 3.1. | Hypovolämischer Schock | 55 |
| 3.1.1. | Verbrennungs- bzw. Verbrühungsschock | 56 |
| 3.1.2. | Traumatischer Schock | 56 |
| 3.1.3. | Schock bei Peritonitis | 57 |
| 3.2. | Cardiogener Schock | 57 |
| 3.3. | Septischer Schock | 58 |
| 3.4. | Anaphylaktischer und anaphylaktoider Schock | 59 |
| 4. | Verschiedene Erkrankungen mit Beteiligung des Kallikrein-Kinin-Systems | 59 |
| 5. | Hereditärer Kininogenmangel | 61 |
| V. | DAS LEUKOKININSYSTEM | 63 |
| VI. | ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION | 64 |
| VII. | LITERATURVERZEICHNIS | 83 |

## I. EINLEITUNG

Kininogen, ein Protein der $\alpha$-Globulin-Fraktion des Plasmas, wurde von zwei Gruppen unabhängig voneinander entdeckt. 1937 beobachtete WERLE, daß die Wirkung von Kallikrein am isolierten Hundedarm durch Vorinkubation mit Serum erheblich gesteigert und der Wirkungseintritt beschleunigt war. Der isolierte Meerschweinchendarm wurde von Kallikrein alleine nicht kontrahiert, erst durch Zusatz von Serum wurde diese Wirkung erzielt. WERLE schloß daraus, daß im Serum ein Substrat vorhanden sein mußte, aus dem Kallikrein enzymatisch eine darmkontrahierende Substanz freisetzte (1). Diese Substanz erhielt den Namen Kallidin, das Substrat wurde entsprechend als Kallidinogen bezeichnet (2).

ROCHA E SILVA konnte 1949 aus einer im Serum befindlichen Vorstufe durch Trypsin und Schlangengift in vivo und in vitro eine pharmakologisch ähnlich wirksame Substanz wie Kallidin freisetzen. Er nannte das wirksame Peptid Bradykinin, die inaktive Vorstufe Bradykininogen (3).

Da sich je nach Versuchsbedingung Kallidin bzw. Bradykinin aus Kallidinogen bzw. Bradykininogen freisetzen ließ, wurde der Oberbegriff Kininogen geprägt. Er bezeichnet einen definierten Stoff des Plasmas, aus dem mit Trypsin und Kallikrein Kinine freigesetzt werden können (4,5).

Kinine sind hypotensive Peptide, die isolierte glattmuskuläre Organe kontrahieren mit Ausnahme des Rattenduodenums, das relaxiert wird. Sie erhöhen die Kapillarpermeabilität, lösen bei Berührung mit Nociceptoren Schmerzempfindung aus und bewirken beim Meerschweinchen eine Bronchokonstriktion. Die wichtigsten Kinine sind Bradykinin, Kallidin und

Met-Lys-Bradykinin. Bradykinin, ein Nonapeptid, dessen Struktur von ELLIOT aufgeklärt wurde (6), wird durch Trypsin, Schlangengiftproteasen und Plasmakallikrein aus Kininogen freigesetzt (7). Kallidin (Lys-Bradykinin), ein Decapeptid, entsteht durch Einwirken von Gewebskallikreinen (Pankreas-, Submandibularis- und Nierenkallikrein) aus Kininogen (8,9). Wird als Substrat Vollplasma verwendet, so entstehen neben Kallidin wechselnde Mengen Bradykinin, was auf eine gleichzeitige Aktivierung von endogenem Plasma-Kallikrein hinweist (10). Auch kann Kallidin in Bradykinin durch eine im Plasma vorhandene Aminopeptidase umgewandelt werden (7). Met-Lys-Bradykinin wurde von ELLIOT (11) als Produkt der Säureaktivierung von Rinderserumglobulin gefunden, neuerdings auch von GUIMARAES et al. (12) durch Inkubation von hochgereinigtem Humankininogen mit Pepsin bei pH 2,0.

Kininogen ist keine einheitliche Substanz. Beim Rind und beim Menschen ist die Existenz von zwei Formen gesichert. Unglücklicherweise wurden die Termini Kininogen I und Kininogen II mit unterschiedlicher Bedeutung von mehreren Autoren eingeführt. So wurde zum Beispiel das Rinderkininogen mit einem Molekulargewicht von 48 000 von HABERMANN (13) Kininogen I genannt, von der japanischen Gruppe um SUZUKI (14) dagegen Kininogen II. Das Polymer dieses Kininogens bezeichnete HABERMANN als Kininogen II, SUZUKI (15) wiederum nannte die höher molekulare Form, die mit Plasmakallikrein gut reagiert, Kininogen I. Dem entspricht die Nomenklatur von JACOBSEN (16,17), dessen "Substrat 1" sich von "Substrat 2" durch sein höheres Molekulargewicht und seine Empfänglichkeit für Plasmakallikrein unterscheidet. PIERCE und WEBSTER (18) benützten die Termini Kininogen I und Kininogen II, um zwischen zwei Formen eines menschlichen Kininogens mit dem Molekulargewicht 50 000 mit unterschiedlicher Position der Kininsequenz zu differenzieren.

Auf der Konferenz über die Nomenklatur des Kininsystems in Florenz 1965 (5) wurde empfohlen, nur noch zwischen LMW (Low Molecular Weight) und HMW (High Molecular Weight) Kininogen zu unterscheiden.

# II. BIOCHEMIE DES KININOGENS

## 1. Bestimmungsmethoden

### 1.1. Biologische Bestimmung

Die Kininogen-Bestimmung mittels biologischer Methoden basiert auf einem indirekten Nachweis. Gemessen werden dabei Kinine, die durch Kininogenasen freigesetzt werden, und die mit Hilfe biologischer Methoden, bevorzugt an isolierten glattmuskulären Organen, bestimmt werden. Die Konzentrationsangabe erfolgt in µg Bradykininäquivalente/ml Plasma. Als Standard wird synthetisches Bradykinin verwendet.

Die verwendete Methode muß folgende Voraussetzungen erfüllen: a) Kininasen und Kininogenasen-Inhibitoren müssen vollständig inaktiviert werden b) nur die zugesetzte Kininogenase ist wirksam und nur eine Art von Kinin wird gebildet c) eine Aktivierung des endogenen kininbildenden Systems wird verhindert.

#### 1.1.1. Serumvorbehandlung

Bei der Blutentnahme können Kontakte mit aktiven Oberflächen (z.B. Kaolin, Glas), Gerinnung oder bestimmte Temperaturen zu einer Aktivierung des endogenen kininbildenden Systems und damit zu einer Änderung des Kininogengehaltes führen. Um eine Aktivierung zu verhindern, sollte nur Plastikmaterial oder silikonisierte Glasware verwendet werden. Zur Gerinnungshemmung eignen sich am besten Heparin oder EDTA. Bei Oxalat- oder Citratplasma erhält man nach einigen Stunden signifikant erniedrigte Kininogenwerte. Das Aufbewahren von Plasma bei - 4° C führt nach zwei Tagen zu einem

Verlust von fast 2/3 des vorhandenen Kininogens. Bei - 20 °C dagegen ändert sich der Kininogengehalt über eine Woche nicht signifikant (19). Kininogenasen-Inhibitoren und Kininasen können durch Erhitzen in saurer Lösung inaktiviert werden. WERLE führte diese Methode ein, indem er Plasma 3 Stunden auf 56°C erhitzte (1). VAN ARMAN verwendete gleiche Teile Plasma und 0,3 %ige Essigsäure und erhitzte wenige Minuten auf 90 °C (20,21). Die Säurebehandlung nach HORTON (22), Ansäuern auf pH 2,0 und 10 Minuten Inkubation bei 37 °C, führt zu einer vollständigen Inaktivierung der Kininasen und Kininogenasen-Inhibitoren. Nach der Methode von DINIZ und CARVALHO (19) wird zu Plasma 0,2 %ige Essigsäure gegeben und 30 Minuten auf 100 °C erhitzt. RINVIK (23) kombinierte HORTON'sche Säurebehandlung (pH 2,0) und 30 Minuten Erhitzen auf 100 °C.

Das Erhitzen in saurer Lösung führt zur Denaturierung des Kininogenmoleküls, was aber bei der Kininogen-Bestimmung mittels Trypsin nicht stört. Bei Verwendung von Kallikrein sollte das Substrat jedoch nativ sein (24). Um dies zu erreichen, werden dem Plasma Kininase-Inhibitoren wie $Na_2EDTA$ (25) oder o-Phenanthrolin (26,27) zugesetzt.

### 1.1.2. Kininogen-Bestimmung mit Trypsin

Zur biologischen Bestimmung des Gesamtkininogens eignet sich Trypsin sehr gut. DINIZ und CARVALHO (19) beschrieben folgende Methode, bei der Trypsin als Kininogenase verwendet wird: zu 1,8 ml 0,2 %iger Essigsäure wird 0,2 ml Plasma gegeben und 30 Minuten auf 100 °C erhitzt. Mit 0,06 ml 1 N Natronlauge und 0,5 ml 0,2 M Tris-HCl-Puffer wird auf pH 7,8 eingestellt und nach Zugabe von 0,1 ml Trypsin (2 mg pro ml) wird 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird mit 5 ml kochendem absolutem Alkohol gestoppt, danach wird noch 10 Minuten auf 70 °C erhitzt. Die anschließende Vakuum-

Trocknung erfolgt bei Temperaturen bis zu 35 °C. Der Rückstand wird in 4 ml Kochsalz-Lösung suspendiert und am Meerschweinchenileum ausgetestet. Statt Trypsin kann auch Schlangengift verwendet werden (28).

BROCKLEHURST und ZEITLIN (29) entwickelten eine Methode zur gleichzeitigen Bestimmung von freiem Kinin und Kininogen in einer Blutprobe. Sofort nach der Abnahme wird 5 ml Blut mit 15 ml Äthanol versetzt und zentrifugiert. Der Überstand enthält freies Kinin, das Sediment Kininogen, das in abgewandelter Form nach DINIZ und CARVALHO bestimmt wird.

Die unterschiedlichsten Methoden zum Stoppen der enzymatischen Reaktion wurden beschrieben. RINVIK (23) erhitzte 5 Minuten auf 100 °C ohne Zugabe von Alkohol. Einfaches Erhitzen der Testlösung genügt jedoch nicht, den Effekt des Trypsins auf das Testorgan auszuschalten. Trypsin selbst kann an glattmuskulären Organen Kontraktionen mit nachfolgender Tachyphylaxie hervorrufen; ferner steigert es die Empfindlichkeit des Testorgans für Bradykinin (30). Eine Vorbehandlung des Testorgans mit Trypsin kann dazu benützt werden, das Muskelpräparat für Trypsin unempfindlicher zu machen und die Empfindlichkeit für Kinine zu steigern (31). Andere Autoren beschrieben Ansäuern und Erhitzen (32) oder Ansäuern und erneute Inkubation bei 37 °C (33) zur Denaturierung von Trypsin. Eine gute Methode, die enzymatische Reaktion zu stoppen, ist die Verwendung von Trypsin-Inhibitoren wie zum Beispiel Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor oder Trasylol$^{R}$ (34,24).

Bei der Kininogen-Bestimmung mit Trypsin konnten HAMBERG (35) und AARSEN (36) zeigen, daß tryptische Plasmahydrolysate Peptide enthalten, die den Effekt von Kininen auf Muskelpräparate potenzieren. Da die potenzierende Wirkung nicht gleichmäßig ist, wird sie bei der Kininogen-Bestimmung mit Trypsin zur Fehlerquelle, die berücksichtigt werden muß. Durch Ionenaustauscherchromatographie können diese Peptide

von dem zu bestimmenden Kinin abgetrennt werden, doch tritt dabei ein Verlust an Kininen von ca. 10 % auf (37).

### 1.1.3. Kininogen-Bestimmung mit Kallikrein

Als Kininogenase wird Gewebskallikrein (zum Beispiel Schweinepankreaskallikrein) oder aktiviertes Serumkallikrein verwendet.

Nach GARBE (26) wird 1 ml Plasma mit 0,6 ml 0,3 N HCl auf pH 2,0 eingestellt, 30 Minuten bei 37 $^{o}$C inkubiert, mit 0,3 N NaOH neutralisiert (pH 7,0) und anschließend mit 1 mg o-Phenanthrolin versetzt. Zu dieser Lösung werden 2 KE/ml Plasma Pankreaskallikrein zugegeben, 45 Minuten bei 37 $^{o}$C inkubiert, danach mit 0,9 %iger NaCl-Lösung auf 5 ml aufgefüllt und anschließend am Meerschweinchenileum getestet.

Im Vergleich zu der Trypsin-Methode werden bei diesem Verfahren nur etwa 30 % Bradykininäquivalente erhalten. Da Pankreaskallikrein nur Kallidin bildet (38) und Kallidin bei der Austestung am Meerschweinchenileum dreimal schwächer wirkt als Bradykinin (39), läßt sich diese Differenz so erklären. Außerdem scheint ein Teil des vorhandenen Kininogens von Pankreaskallikrein nicht abgebaut zu werden, denn eine fortgesetzte Inkubation mit Trypsin ergibt eine zusätzliche Bradykininbildung (38,10).

BRISEID et al. (40,41) beschrieben eine Methode, bei der durch Aceton aktiviertes Plasmakallikrein als Kininogenase dient. Die optimale Acetonkonzentration betrug 16,7 %. Mit zwei unterschiedlich gewonnenen Substraten (Substrat I: 0,4 mg $Na_2EDTA$/ml Citratplasma, 30 Minuten Erhitzen auf 37 $^{o}$C; Substrat II: Plasma wird mit 1 N Hydrochlorsäure auf pH 5,0 eingestellt, 0,4 mg $Na_2EDTA$/ml Citratplasma, 30 Minuten Erhitzen auf 37 $^{o}$C) wurden Kininausbeuten

erreicht, die mit den nach der Trypsin-Methode erhaltenen in guter Übereinstimmung stehen. Von Nachteil ist die lange Inkubationsdauer von ca. 10 Stunden, die notwendig ist, um eine vollständige Ausbeute zu erhalten. Eine andere Methode, Plasmakallikrein zu aktivieren, ist die Kontaktaktivierung mit Glas. Nach ERDÖS (42) werden zu 0,5 ml Citratplasma 0,7 ml 0,2 M Tris-HCl-Puffer pH 7,4 und 0,3 ml einer $10^{-2}$ M o-Phenanthrolinlösung gegeben. Nach Zusatz von 500 mg gewaschenen Glasperlen wird die Mischung 10 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Da die Kontaktaktivierung über den Hageman-Faktor verläuft, kann die Reaktion durch einen Verbrauch dieses Faktors vorzeitig abgebrochen werden. Deshalb wird in einer neueren Abwandlung der beschriebenen Methode der Mischung statt Glasperlen speziell präparierter aktiver Hageman-Faktor zugesetzt (43). Die Ausbeute mit dieser Methode ist relativ gering. Vorwiegend wird das rasch von Plasmakallikrein umgesetzte HMW-Kininogen nachgewiesen.

## 1.2. Immunologische Bestimmung

SPRAGG et al. wendeten für die immunologische Bestimmung des Kininogens die Methode der radialen Immunodiffusion an (44). Die durch Immunisierung von Kaninchen mit Kininogen erhaltenen Antikörper waren jedoch nicht vollständig rein, so daß das Antiserum mit den kontaminierenden Proteinen Albumin und Transferrin absorbiert wurde. Nach den Untersuchungen von HAMBERG (45) muß allerdings angenommen werden, daß dieses absorbierte Antiserum immer noch nicht monospezifisch war. Sie fand bei hochgereinigtem Kininogen eine Beimengung von ca. 30% Alpha-2HS-Glycoprotein, das große Ähnlichkeit mit Kininogen besitzt. Nur vollständig reines Kininogen kann jedoch als Standard verwendet werden.

Da die Kininogen-Antikörper mit intaktem als auch mit kininfreiem Kininogen kreuzreagieren, wird mit dieser Methode auch funktionell nicht mehr intaktes Kininogen erfasst (44).

## 2. Isolierung und biochemische Eigenschaften

Die Isolierung von Kininogen aus Serum ist recht schwierig, da primär in der ersten Isolierungsphase eine Aktivierung von Serumpräkallikrein zu Serumkallikrein unbedingt verhindert werden muß (vgl. II, 1.1.1.). Bei weiteren Reinigungsschritten muß eine vollständige Abtrennung von Proteasen wie Kallikrein, Plasmin und Hageman-Faktor erfolgen, die das Kininogen inaktivieren würden.

Zu Beginn der Versuche zur Kininogen-Isolierung wurden Ammoniumsulfat- (3) und Alkohol-Fällungen (2o) durchgeführt, jedoch erst die Einführung neuer Techniken der Protein-Isolierung führte zu hoch angereicherten Kininogen-Präparaten.

### 2.1. Menschliches Kininogen

Von vielen Arbeitsgruppen wurden in den letzten Jahren Isolierverfahren für menschliches Kininogen ausgearbeitet, die jedoch alle Mängel aufweisen. Im Nachfolgenden eine Zusammenfassung der Isoliermethoden.

Methode nach PIERCE und WEBSTER 1966 (18)

Ausgangsmaterial ist ACD-Plasma. Die Isolierung erfolgte nach folgendem Schema:

1. DEAE-Cellulose (stufenweiser Phosphat-Puffer-Gradient, 0,125 M - 0,175 M)
2. DEAE-Cellulose (linearer Phosphat-Puffer-Gradient, 0,05 M - 0,2 M)
3. Hydroxylapatit (linearer Phosphat-Puffer-Gradient, 0,002 M - 0,2 M)

   a) Erster Aktivitätsgipfel ⟶ uneinheitliches Material (Monomere und wahrscheinlich Dimere)

   b) Zweiter Aktivitätsgipfel

4 a. Sephadex G-200 von 3 a ⟶ zwei Aktivitätsgipfel, nicht näher untersucht

4 b. Sephadex G-200 von 3 b

5. Hydroxylapatit von 4 b (linearer Phosphat-Puffer-Gradient, 0,01 M - 0,15 M, 1 M NaCl)

⟶ Kallidinogen I (spez. Akt. 13,2 µg/mg Protein, Anreicherung 220 fach, Ausbeute 1,2 %)

⟶ Kallidinogen II (spez. Akt. 20,7 µg/mg Protein, Anreicherung 345 fach, Ausbeute 0,97 %)

Die Isolierung wurde bei einer Temperatur von 2°C und pH-Werten um 6,0 durchgeführt.

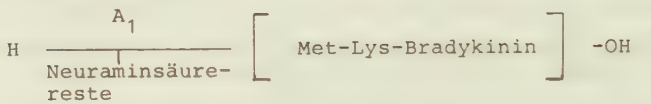
Das Molekulargewicht einer Mischung der beiden Fraktionen Kallidinogen I und Kallidinogen II wurde mittels Gleichgewichtzentrifugation zu 50.000 ± 5.000 bestimmt. Beide Kininogene waren saure Glycoproteine mit einem Hexosegehalt von 5,5 % (I) bzw. 5,0 % (II) und einem Hexosamingehalt von 1,8 % bzw. 1,2 %. Die Aminosäurezusammensetzung beider Kininogene zeigte keine wesentlichen Unterschiede. Beide enthielten beträchtliche Mengen Glutamin- und Asparaginsäure und Cystin, aber nur wenig Methionin und Histidin.

Die immunologische Untersuchung ergab keinen Unterschied zwischen Kallidinogen I und II bzw. zwischen intaktem und kininfreiem Kininogen.

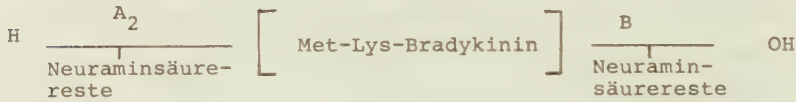
Durch Carboxypeptidase wurde Kallidinogen I inaktiviert, was vermuten ließ,daß die Kininsequenz eine C-terminale Position einnimmt. Kallidinogen II blieb voll aktiv, d. h. der Argininrest seiner Kininsequenz mußte geschützt lokalisiert sein. Die Spaltung mit Bromcyan, eine Substanz, die selektiv Methionyl-Peptidbindungen spaltet, ergab bei Kallidinogen I eine weit größere Freisetzung von Kininaktivität als bei Kallidinogen II, ein weiterer Hinweis auf die terminale Position der Kininsequenz bei I und ein Hinweis auf das Vorhandensein einer Met-Lys-Bradykininsequenz in menschlichem Kininogen. Die Disk-Gel-Elektrophorese von Kallidinogen I und II nach Inkubation mit Kallikrein und Neuraminidase bzw. nach Inkubation mit beiden Enzymen nacheinander ließ darauf schließen, daß beide Fraktionen Neuraminsäurereste enthielten; das an das Arginin der Kininsequenz anschließende niedermolekulare Fragment von Kallidinogen II wahrscheinlich sogar drei Reste.

Folgende Strukturmodelle wurden von PIERCE 1968 (46) vorgeschlagen:

KALLIDINOGEN I




KALLIDINOGEN II




$A_1$ und $A_2$ sind hochmolekulare Fragmente, B ist ein niedermolekulares Glykopeptid.

Methode nach BROCKLEHURST und MAWER 1966 (47)

Ausgangsmaterial ist Heparin-Plasma. Folgendes Isolierschema wurde angewandt:

1. Sephadex G-50 (0,02 M Phosphatpuffer pH 7,35, 0,1 M NaCl)

2. DEAE-Sephadex A-50 (0,02 M Phosphatpuffer pH 7,35, stufenweiser NaCl-Gradient 0,1 M - 0,18 M

3. Sephadex G-200 (0,02 M Phosphatpuffer pH 7,35, 0,1 M NaCl)

⟶ Kininogen (spez.Akt. 5,2 µg/mg Protein, Ausbeute 40 %)

⟶ höhermolekulares Kininogen, nicht näher untersucht.

Das Molekulargewicht wurde mit Hilfe der Gel-Filtration an Sephadex G-200 zu ca. 100.000 bestimmt. Weitere Eigenschaften wurden nicht beschrieben.

Methode nach JACOBSON und KRIZ 1967 (48)

Ausgangsmaterial ist Citratplasma. Isolierschema:

1. DEAE-Sephadex A-50 (0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0, linearer NaCl-Gradient 0,2 M - 0,35 M)

   ⟶ Substrat 1
   ⟶ Substrat 2

Weitere Isolierung von Substrat 1

2. Sephadex G-200 (0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0, 0,2 M NaCl)
3. DEAE-Sephadex A-50 (0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0, Elution mit 0,35 M NaCl)
4. Präparative Disk-Gel-Elektrophorese (Polyacrylamid-Gel)

   ⟶ Substrat 1 (spez. Akt. 4,0 µg/mg Protein, Anreicherung 588 fach)

Weitere Isolierung von Substrat 2

2. Massive Kontakt-Exposition (100 mg Silikatpuder pro ml)
3. DEAE-Sephadex A-50 (0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0, 0,1 M - 0,25 M NaCl)
4. Sephadex G-200 (0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0, 0,2 M NaCl)
5. DEAE-Sephadex A-50 (0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0, Elution mit 0,25 M NaCl)
6. Präparative Disk-Gel-Elektrophorese (Polyacrylamid-Gel)

   ⟶ Substrat 2 (spez. Akt. 3,7 µg/mg Protein, Anreicherung 137 fach)

Sämtliche Reinigungsschritte wurden bei Raumtemperatur (20 °C) durchgeführt.

JACOBSON beschrieb bereits 1966 (16,17) zwei verschiedene Kininogene, deren Trennung durch Gel-Filtration an Sephadex G-200 oder durch Chromatographie mit DEAE-Sephadex A-50 gelang. Substrat 1 war höhermolekular, instabil bei Aufbewahrung in Glasgefäßen und bei niedrigen Temperaturen und bildete sowohl mit menschlichem Plasma-Kallikrein (Pseudoglobulin) als auch mit Drüsenkallikrein (Submandibulariskallikrein oder Padutin) Kinine. Substrat 2 war relativ stabil und bildete nur mit Drüsenkallikrein Kinin. Durch die angewandte Isoliermethode (48) wurde eine bessere Reinigung dieser Substrate erzielt. Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte nach SIEGEL und MONTY (49). Der Stoke'sche Radius wurde durch Gel-Filtration ermittelt, die Sedimentationskonstante durch Saccharosegradienten-Ultrazentrifugation. Substrat 1 ist mit einem Molekuargewicht von 197.000 ($S_{20/w}$ = 7,68) das HMW-Kininogen, Substrat 2 mit einem Molekulargewicht von 57.000 ($S_{20/w}$ = 3,65) das LMW-Kininogen. Elektrophoretisch wanderte Substrat 1 mit den ß-Globulinen, Substrat 2 mit den $\alpha_1$-Globulinen.

Methode nach SPRAGG und AUSTEN 1971 (50)

Ausgangsmaterial ist EDTA-Plasma mit Zusatz von Hexadimethrinbromid. Isolierschema:

1. DE-52 (0,05 M Phosphat-Puffer pH 7,5, linearer NaCl-Gradient 0 - 0,1 M, Hexadimethrinbromid)
2. Sephadex G-100 (0,05 M Phosphat-Puffer pH 7,5, Hexadimethrinbromid)
3. Präparative Disk-Gel-Elektrophorese (Acrylamid-Gel)

⟶ Kininogen

Mit dieser Methode wurde von den Autoren nur ein Kininogen mit einem Molekulargewicht von 70.000 isoliert (bestimmt nach SIEGEL und MONTY; Stoke'scher Radius = 3,9, Sedimentations-

konstante $S_{20/w}$ = 4,0 und partielles spezifisches Volumen = 0,75). Elektrophoretisch wanderte dieses Kininogen in der $\alpha$-Region vor Transferrin, der isoelektrische Punkt lag bei einem pH von 4,6 $\pm$ 0,1. Es erwies sich als gleich gutes Substrat sowohl für menschliches Plasma- als auch für Nierenkallikrein. Die Inkubation mit Carboxypeptidase B ergab eine geschützte Lokalisation der Kininsequenz innerhalb des Moleküls. Mit radioaktiv markiertem Bradykinin wurde gezeigt, daß Antikörper gegen Kininogen die Kininsequenz nicht erkennen. Antikörper gegen Bradykinin reagierten jedoch mit der entsprechenden Sequenz im Kininogenmolekül.

Ferner wurden von dieser Gruppe durch Chromatographie mit DEAE-Sephadex A-50 bei Raumtemperatur zwei verschiedene Kininogene isoliert und nach ihrer elektrophoretischen Wanderung Prätransferrin-Kininogen und Post-Transferrin-Kininogen genannt (51). Prätransferrin-Kininogen war etwas leichter als Albumin, das partielle spezifische Volumen war 0,76, Posttransferrin-Kininogen war etwas schwerer als Albumin und besaß ein partielles spezifisches Volumen von 0,73. Die unterschiedliche Wanderung im elektrischen Feld konnte durch Zusatz von 8 M Harnstoff aufgehoben werden, beide Kininogene wanderten dann zur Pretransferrin-Region.

Methode nach COCHRANE und WUEPPER 1971 (52,53)

Ausgangsmaterial ist EDTA-Plasma mit Hexadimethrinbromid. Folgendes Isolierschema wurde angewandt:

1. Ammoniumsulfatfällung (50% Sättigung)
2. DEAE-Sephadex A-50 (pH 8,0, linearer NaCl-Gradient)
3. CM-Sephadex C-50 (pH 6,0)
4. Sephadex G-200
5. Präparative Disk-Gel-Elektrophorese (Acrylamid-Gel)

$\longrightarrow$ Kininogen

Das Molekulargewicht dieses Kininogens wurde mittels Gel-Filtration zu 90.000 - 100.000 bestimmt. Aus $S_{20/w}$ = 3,8 und $D_{20/w}$ = 4,7 wurde ein Molekulargewicht von 79.000 berechnet. Der isoelektrische Punkt betrug 5,1 - 5,2. Es wurde gezeigt, daß dieses Kininogen von Trypsin, menschlichem Nierenkallikrein als auch von Plasmakallikrein gespalten wird.

Methode nach HABAL und MOVAT 1972 (54)

Ausgangsmaterial ist EDTA-Plasma; Isolierschema:

1. QAE-Sephadex A-50 (0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0, stufenweiser NaCl-Gradient, EDTA und o-Phenanthrolin)
2. Sephadex G-200 fein (0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0, 0,5 M NaCl, EDTA, O-Phenanthrolin)
3. CM-Sephadex C-50 (0,03 M Na-Acetat-Puffer pH 5,8, linearer NaCl-Gradient 0,05 M - 0,6 M, EDTA, o-Phenanthrolin)

   ⟶ LMW-Kininogen ($S_{20/w}$ = 3,8, pI = 5,2)

   ⟶ HMW-Kininogen ($S_{20/w}$ = 4,2, pI = 4,8)

Die Isolierung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

Bei der Inkubation mit Trypsin bzw. menschlichem Plasmakallikrein zeigten beide Kininogene einen deutlichen Unterschied: mit Plasmakallikrein wurden aus HMW-Kininogen im Vergleich zu LMW-Kininogen mehr Kinine freigesetzt. Nach Erhitzen der Substrate vor der Inkubation trat dieser Unterschied besonders deutlich hervor.

| | Trypsin | Plasmakallikrein |
|---|---|---|
| LMW | 1,32 | 0,24 |
| LMW erhitzt | 1,32 | 0,24 |
| HMW | 1,5 | 0,93 |
| HMW erhitzt | 1,5 | 1,72 |

µg Bradykininäquivalente/ml Kininogen-Lösung

Anhand der Disk-Elektrophorese wurde gezeigt, daß beide Kininogene in relativ unreiner Form vorlagen.

Um zu reineren Substraten zu gelangen, wurde der Isolierungsvorgang wie folgt abgewandelt:

Methode nach HABAL 1974 (55)

Ausgangsmaterial ist ACD-Plasma. Isolierschema:

1. QAE Sephadex A-50 (0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0, stufenweiser NaCl-Gradient, EDTA, Raumtemperatur)

Die folgenden Reinigungsschritte wurden bei einer Temperatur von + 4°C durchgeführt.

2. Ammoniumsulfatfällung (40 - 50 % Sättigung)
3. Sephadex G-200 (0,01 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0, 0,5 M NaCl, EDTA)
4. Ammoniumsulfatfällung (40 - 50 % Sättigung)
5. CM-Sephadex C-50 (0,03 M Na-Acetat-Puffer pH 5,8, linearer NaCl-Gradient 0,05 M - 0,6 M)
6. Ammoniumsulfatfällung (40 - 50 % Sättigung)

→ HMW-Kininogen (spez. Akt. 7,8 µg/mg Protein, Ausbeute 53 %)

Zur Isolierung von LMW-Kininogen wurde noch ein weiterer Reinigungsschritt angeschlossen:

7. Sp-Sephadex C-50 (0,03 M Citrat-Phosphat-Puffer pH 3,5, linearer NaCl-Gradient 0,05 M - 0,5 M)

⟶ LMW-Kininogen (spez. Akt. 8,0 µg/mg Protein, Ausbeute 46 %)

In der Elektrophorese zeigte das LMW-Präparat eine einzige Bande, HMW-Kininogen zwei eng beieinanderliegende parallele Banden. Auch diese gereinigten Präparate wiesen einen deutlichen funktionellen Unterschied auf: nach 10 Minuten Inkubation äquipotenter Mengen Kininogen mit menschlichem Plasmakallikrein war bei HMW-Kininogen nur 1/60 Enzymmenge notwendig, um dieselbe Menge an Kininen freizusetzen wie bei LMW-Kininogen.

Molekulargewichtsbestimmungen beider Fraktionen wurden mittels Gel-Filtration unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt (56). LMW-Kininogen besaß sowohl bei der Gel-Filtration mit Sephadex G-200 als auch mit Guanidin-Sepharose 4B ein Molekulargewicht von 52.000 ± 3.000. Auch nach Reduktion mit Dithiothreitol und Alkylierung mit Jodacetamid änderte sich dieser Wert nicht wesentlich. Im Gegensatz dazu wurde für HMW-Kininogen bei Filtration mit Sephadex G-200 ein Molekulargewicht von 210.000 ± 10.000 ermittelt, mit Guanidin-Sepharose 4B 108.000 ± 10.000 und nach Reduktion und Alkylierung wurden zwei Fragmente mit Molekulargewichten von 70.000 ± 5.000 und 55.000 ± 5.000 gefunden.

Immunologisch waren beide Substrate sehr ähnlich. Nach Inkubation mit Antikörpern gegen LMW-Kininogen konnte mit LMW- und mit HMW-Kininogen fast keine Kininbildung (ca. 90 % Hemmung) mehr erreicht werden, umgekehrt neutralisierten Antikörper gegen HMW-Kininogen beide Substrate.

Methode nach SEIDEL 1973 (57)

Ausgangsmaterial ist Citratplasma versetzt mit Hexadimethrinbromid. Isolierschema:

1. Ammoniumsulfat-Fällung (30 - 50 % Sättigung, Raumtemperatur)
2. DEAE-Sephadex A-50 (0,02 M K-Phosphat-Puffer pH 8,0, linearer NaCl-Gradient 0,1 M - 0,3 M Hexadimethrinbromid, 4 °C)
3. Sephadex G-200 (0,2 M K-Phosphat-Puffer pH 8,0, 0,1 M NaCl, Protamin-HCl, 4 °C)

→ LMW-Kininogen

→ HMW-Kininogen

Durch Gel-Filtration wurde das Molekulargewicht von LMW-Kininogen zu 50.000, das von HMW-Kininogen zu 110.000 bestimmt.

Trypsin und Pankreaskallikrein bildeten mit beiden Formen Kinine, Kininogenase II (= kontaktaktiviertes Plasmakallikrein) dagegen setzte bevorzugt aus HMW-Kininogen Kinine frei.

Aus Plasma, das zuvor glasaktiviert wurde, konnte nur LMW-Kininogen gewonnen werden. Andererseits führte Vorbehandlung des Plasmas mit Urokinase zum Verschwinden der LMW-Fraktion.

Methode nach GUIMARAES 1974 (58,59)

Ausgangsmaterial ist ACD-Plasma, Zusatz von Hexadimethrinbromid.

1. DEAE-Cellulose (Elution mit 0,4 M Tris-HCl-Puffer pH 6,0)
2. Affinitätschromatographie mit Anti-Kininogen-Immunoadsorbens (Phosphat-Puffer, NaCl, pH 7,0, Elution mit 8 M Guanidin-HCl)
3. DEAE-Cellulose (Phosphat-Puffer pH 6,0, linearer Gradient 0,05 - 0,30 M)

→ 4 Fraktionen

B 1

B 2 (spez. Akt. 20 µg/mg Protein)

B 3

B 4 (spez. Akt. 12 µg/mg Protein)

Die anschließende Gel-Filtration mit Bio-Gel A 0,5 M ergab Molekulargewichte um 80.000, 150.000 und 225.000, die sich auf die verschiedenen Fraktionen wie folgt verteilten (60):

| DEAE-CELLULOSE | GEL-FILTRATION ( M.G. ) | | | |
|---|---|---|---|---|
| Kininogen-Fraktion | α(-80.000) | β(-150.000) | γ(-225.000) | α+β+γ |
| | % des Gesamtkininogens | | | |
| B 1 | 2,9 | 0,2 | 0,0 | 3,1 |
| B 2 | 35,3 | 1,5 | 0,0 | 36,8 |
| B 3.1 | 8,5 | 5,5 | 0,0 | 14,0 |
| B 3.2 | 11,5 | 13,6 | 0,0 | 25,1 |
| B 4 | 0,9 | 12,3 | 7,8 | 21,0 |

Kinetische Studien der vier Fraktionen mit menschlichem Plasma- und Nierenkallikrein zeigten, daß sich die B 4-Formen funktionell deutlich von den anderen Fraktionen unterschieden: z.B. betrug die Michaelis-Konstante ($K_M$ in mg/ml) von B 2 α bzw. B 4 β 0,65 bzw. 0,61 mit Nierenkallikrein, mit Plasmakallikrein war $K_M$ von B 2α 8,3, von B 4 β jedoch 0,4.

Methode nach HAMBERG 1975 (45)

Ausgangsmaterial ist ACD-Plasma.

1. Ammoniumsulfat-Fällung (Raumtemperatur)

Ab Schritt 2 wurde bei Temperaturen von + 4 °C gearbeitet.

2. Sephadex G-200 (0,1 M Ammoniumacetat-Puffer pH 6,0, 1 M NaCl)

→ LMW-Kininogen

→ HMW-Kininogen (geringer Anteil, nicht näher untersucht)

Weitere Isolierung von LMW-Kininogen:

3. DEAE-Cellulose (0,05 M Natriumphosphat-Puffer pH 6,0, 0,05 M NaCl, Zusatz von Trasylol$^R$ und 6-Aminocapronsäure, Elution mit 0,5 M NaCl)

4. DEAE-Sephadex A-50 (0,2 M 6-Aminocapronsäure pH 6,0, linearer Gradient 0,06 M - 0,30 M NaCl, Trasylol$^R$)

5. Sephadex G-100 (0,1 M Ammoniumacetat-Puffer pH 6,0, 0,5 M NaCl, 6-Aminocapronsäure, Trasylol$^R$)

→ LMW-Kininogen (spez. Akt. 14 - 20 µg/mg Protein, Anreicherung ca. 250 fach)

Trotz der hohen spezifischen Aktivität enthielt dieses Kininogen immer noch ca. 30 % Alpha-2 HS -Glykoprotein, das weder durch Disk-Gel-Elektrophorese noch durch isoelektrische Fokusierung abzutrennen war. Nur durch Immunosorption konnte immunologisch reines Kininogen erhalten werden. Dabei wurden zwei Verfahren angewandt, erstens Entfernung der kontaminierenden Proteine durch Adsorption an die entsprechenden polymerisierten Antikörper und zweitens Adsorption des Kininogens an polymerisiertes Antiserum und anschließende Desorption. Die Anreicherung mit konventionellen Methoden vor der Immunosorption ist notwendig, da sich bei mehreren Adsorption-Desorption-Schritten eine unspezifische Adsorption bemerkbar macht.
Bei der Gel-Filtration mit Sephadex G-200 wurde HMW-Kininogen gefunden, das von der weiteren Reinigung ausgeschlossen wurde. Auch eine bei der Chromatographie mit DEAE-Sephadex (Schritt 4) erscheinende kleinere Komponente (Dimeres?) wurde nicht näher charakterisiert. Die Hauptkomponente konnte durch

Hydroxylapatit-Chromatographie in zwei Fraktionen aufgetrennt werden: ca. 80 % Kininogen I (Kininsequenz C-terminal) ca. 20 % Kininogen II (Kininsequenz mittelständig).
Der isoelektrische Punkt betrug 4,9 ± 0,2, der Neuraminsäuregehalt (korrigiert, d. h. nach Berücksichtigung des Gehaltes an Alpha-2 HS-Glykoprotein) ungefähr 55 µg/mg = 8,6 Mol/ 50.000 (61).
Die folgende Tabelle zeigt die Aminosäurezusammensetzung einer Mischung von Kininogen I und II. Bei der Berechnung wurde ein Molekulargewicht von 50.000 angenommen.

| | HAMBERG | 1975 | PIERCE | 1966 |
|---|---|---|---|---|
| | unkorrigiert | korrigiert | I | II |
| Lys | 19 | 20 | 20 | |
| His | 5 | 2 | 4 | |
| Arg | 11 | 11 | 10 | |
| Asp | 29 | 27 | 30 | 24 |
| Thr | 20 | 21 | 22 | 17 |
| Ser | 20 | 19 | 21 | 18 |
| Glu | 34 | 31 | 38 | 33 |
| Pro | 17 | 7 | 14 | 13 |
| Gly | 14 | 10 | 16 | 15 |
| Ala | 20 | 12 | 16 | 16 |
| Cys | 3 | 1 | 6 | 3 |
| Val | 17 | 9 | 15 | 15 |
| Met | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Ile | 11 | 12 | 13 | 11 |
| Leu | 21 | 16 | 16 | 14 |
| Tyr | 8 | 9 | 9 | 8 |
| Phe | 12 | 12 | 12 | 10 |

Mole/Mol Kininogen

Tab. 1: Aminosäurezusammensetzung des LMW-Kininogens (im Vergleich zu Kininogen I und II nach PIERCE 1966)

Methode nach NAGASAWA und NAKAYASU 1975 (62)

Die Autoren wandten zur Isolierung eine Modifikation der Methode von HABAL (siehe Seite 16) an. Sie fanden ein LMW-Kininogen mit einem Molekulargewicht von 78.000 und ein HMW-Kininogen mit einem Molekulargewicht von 120.000.

Um die Frage der Lokalisation der Kininsequenz innerhalb des Kininogen-Moleküls zu klären, wurden beide Kininogene mit Kallikrein inkubiert, das kininfreie Molekül anschließend reduziert und mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese analysiert.

HMW-Kininogen (MG 120.000) —Plasmakallikrein→ kininfreies Protein (MG 76.000) —2-Mercapto-→

—Äthanol→ Polypeptid-Fragmente (MG 55.000 - 65.000)

LMW-Kininogen (MG 78.000) —Pankreaskallikrein→ kininfreies Protein (MG 76.000) —2-Mercapto-→

—Äthanol→ Polypeptid-Fragment (MG 70.000)

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die Kininsequenz in einer Schleife der Polypeptidkette, die durch Disulfidbrücken verbunden ist, lokalisiert ist; und zwar bei HMW-Kininogen im Zentrum des Moleküls, bei LMW-Kininogen dagegen im terminalen Bereich. Die Spaltung mit Bromcyan setzte aus HMW-Kinino-

gen ein kininlieferndes Peptid mit dem Molekulargewicht 8.000 frei, aus LMW-Kininogen ein großes Fragment mit dem Molekulargewicht 45.000. Durch Reduktion dieses Fragments wurde ein kininlieferndes Peptid mit dem Molekulargewicht 9.000 erhalten. Im Gegensatz zum Rinderkininogen scheint sich also im menschlichen Kininogen kein Methionin-Rest in der Nähe des Carboxylendes der Kininsequenz zu befinden.

Tab. 2: Zusammenstellung der Daten von Humankininogen

| Autor | Kininogen | spez.Akt. [µg/mg Prot] | Molekulargewicht [dalton] | $S_{20/w}$ | pI | Elpho | Kininsequenz | Umsatz mit Plasmakallikrein |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Pierce und Webster (1966) | Kallidinogen I | 13,2 | 50.000 | | | | C-terminal mittelständig | |
| | Kallidinogen II | 20,7 | | | | | | |
| Brocklehurst und Mawer (1966) | Kininogen | 5,2 | 100.000+) | | | | | |
| Jacobsen (1966) | Substrat 1 | 4,0 | 197.000 | 7,68 | | ß | | ++ |
| Jacobsen und Kriz (1967) | Substrat 2 | 3,7 | 57.000 | 3,65 | | $\mathcal{L}_1$ | | Ø |
| Spragg und Austen (1971 u. 1974) | Kininogen | | 70.000 | 4,0 | 4,6 | $\mathcal{L}$ | mittelständig | + |
| | Prätransf.-K. | | leichter als Alb. | | | $\mathcal{L}$ | | |
| | Posttransf.-K | | schwerer als Alb. | | | ß | | |
| Cochrane und Wuepper (1971) | Kininogen | | 90.000 - 100.000+) 79.000 | 3,8 | 5,1-5,2 | | | + |

+) bestimmt durch Gel-Filtration

\+ Umsatz mit Plasmakallikrein und mit anderen Kallikreinen

++ bevorzugter Umsatz mit Plasmakallikrein

Ø kein Umsatz mit Plasmakallikrein

| Autor | Kininogen | spez. Akt. [µg/mg Prot.] | Molekulargewicht [dalton] | $S_{20/w}$ | pI | Elpho | Kininsequenz | Umsatz mit Plasmakallikrein |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Habal und Movat (1972) | LMW-Kininogen | 8,0 | 52.000+) | 3,8 | 5,2 | $\alpha_1$ | | gering |
| Habal et al (1974,75) | HMW-Kininogen | 7,8 | 210.000+) (108.000 Guanidin-Sepharose) | 4,2 | 4,8 | ß | | ++ |
| Seidel (1973) | LMW-Kininogen<br>HMW-Kininogen | | 50.000+<br>110.000+ | | | | | gering<br>++ |
| Guimaraes et al (1974), Pierce und Guimaraes (1975) | B 1<br>B 2<br>B 3<br>B 4 | 20,0<br>12,0 | 80.000+)<br>150.000+)<br>225.000+) | | | | | gering<br>++ |
| Hamberg et al (1975) | Kininogen I<br>Kininogen II | 14 - 20 | | 3,95 | 4,9 ±0,2 | | C-termin. mittelständig | |
| Nagasawa und Nakayasu (1975) | LMW-Kininogen<br>HMW-Kininogen | | 78.000<br>120.000 | | | | terminal. Bereich mittelständig | ++ |

+) bestimmt durch Gel-Filtration

\+ Umsatz mit Plasmakallikrein und mit anderen Kallikreinen

++ bevorzugter Umsatz mit Plasmakallikrein

Ø kein Umsatz mit Plasmakallikrein

## 2.2. RINDER-KININOGEN

### 2.2.1. LMW-Rinder-Kininogen

Isolierungsmethode nach HABERMANN 1963 (4,28)

Ausgangsmaterial ist Rinderserum.

| | |
|---|---|
| 1. Äthanolfällung | (Schema IV-6 nach COHN, anschließende Unterfraktionierung nach SURGENOR) |
| 2. Calciumhydroxylapatit | (Phosphat-Puffer pH 6,8, stufenweiser Gradient 0,005 M - 0,1 M) |
| 3. Calciumhydroxylapatit | (Phosphat-Puffer, 0,01 M Natriumacetat, pH 5,2, linearer Gradient 0,01 M - 0,8 M Phosphat-Puffer) |
| 4. DEAE-Sephadex A-50 | (Phosphat-Puffer pH 6,8, linearer Gradient 0,025 M - 0,4 M NaCl) |
| ⟶ LMW-Kininogen | (spez. Akt. 20 ± 2 µg/mg Protein) |

Eine höhermolekulare Form, die durch Gel-Filtration mit Sephadex G-200 abzutrennen war, erwies sich als Artefakt, wahrscheinlich ein Dimeres, das bei niedrigem pH gebildet wird (13).

Methode nach SUZUKI 1974 (63)

Als Ausgangsmaterial wurde zunächst erhitztes, angesäuertes (pH 4,9) Rinder-Pseudoglobulin verwendet, das mittels Chromatographie an DEAE-Cellulose und CM-Cellulose ein Kininogenpräparat lieferte, das im wesentlichen mit HABERMANNS Kininogen übereinstimmte (64,14). Die Isoliermethode wurde später mehrfach abgeändert (65,63).

Ausgangsmaterial: EDTA-Plasma

1. DEAE-Sephadex A-50 (0,02 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5, 0,1 M NaCl, Elution mit 0,2 M Acetat-Puffer pH 6,2, 0,6 M NaCl)
2. CM-Sephadex C-50 (0,05 M Acetat-Puffer pH 6,2, linearer NaCl-Gradient 0,25 M - 0,8 M, Hexadimethrinbromid, 4 °C)
3. DEAE-Sephadex A-50 (0,02 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5, 0,1 M NaCl, Elution mit 0,4 M NaCl)

   CM-Cellulose (0,005 M Natriumacetat)
4. Sephadex G-100 (0,05 M Phosphatpuffer pH 8,0, 4 °C)

   2-fach
5. DEAE-Sephadex A-50 (0,01 M Phosphat-Puffer pH 8,0, linearer NaCl-Gradient 0,05 M - 0,4 M)

   2-fach

⟶ LMW-Kininogen (spez. Aktivität 17,4 µg/mg Protein)

Die folgende Tabelle enthält eine Übersicht der wichtigsten Daten des LMW-Kininogens des Rinds.

| | SUZUKI (14,66) | HABERMANN (13,28) |
|---|---|---|
| spez. Akt. (µg/mg Protein) | 17 | 18-20 |
| Mol.-Gewicht (aus $S_{20/w}$ $D_{20/w}$) | 46.000 | 48.000 |
| Mol.-Gewicht aus pharm. Daten | | 53.000 |
| Mol.-Gewicht aus der quant. AS-Analyse | 49.500 | |
| Sedimentationskonstante ($S_{20/w}$) | 3.66 | 3.58 |
| Diffusionskonst. ($D_{20/w}$) | 6.16 | 6.15 |
| Part. spez. Vol. v (ml/g) | 0.688 | |
| Isoelektrischer Punkt | 3.3 | 3.3 - 3.6 |
| N-terminale Aminosäure | Ser | ? |
| C-terminale Aminosäure | Leu | Leu |
| Kinin-Sequenz | mittelständig | mittelständig |
| Galaktose (%) | 4.9 | } 5.5 |
| Mannose (%) | 2.5 | |
| Glucosamin (%) | 6.7 | 7.0 |
| Neuraminsäure (%) | 5.7 | 6.1 |
| Kohlehydrat gesamt (%) | 19.8 | 18.6 |

Tab. 3: Daten des LMW-Kininogens des Rinds

Die Aminosäurezusammensetzung des Kininogens beider Gruppen zeigte ebenfalls weitgehende Übereinstimmung.

| | HABERMANN (31) | SUZUKI (14) |
|---|---|---|
| Asp | 31 | 36 |
| Thr | 20 | 23 |
| Ser | 24 | 28 |
| Hoser | 0 | |
| Glu | 39 | 43 |
| Pro | 20 | 25 |
| Gly | 16 | 19 |
| Ala | 21 | 27 |
| Val | 21 | 30 |
| 1/2 Cys | 12 | 13 |
| Met | 3 | 3 |
| Ile | 12 | 15 |
| Leu | 19 | 26 |
| Tyr | 11 | 11 |
| Phe | 12 | 13 |
| Lys | 21 | 22 |
| His | 6 | 8 |
| Arg | 8 | 10 |
| Tyr | | 4 |

Mole Aminosäure / Mol Kininogen

Tab. 4: Aminosäure-Zusammensetzung des LMW-Kininogens des Rinds

Nach Inkubation mit Schlangengift wurde nur ein einheitliches Restmolekül gefunden, obwohl die Kininsequenz mittelständig lokalisiert war. Die Kininsequenz mußte also zwischen S-S-Brücken bildenden Cystein-Resten lokalisiert sein (15). Weitere Untersuchungen zur Konformation des Kininogens (66) zeigten einen niedrigen $\alpha$-Helix-Gehalt. Einige Teile des Moleküls wiesen ß-Struktur auf, die Reduktion und Carboxylierung veränderte diese Struktur beträchtlich. Mit Trypsin und Schlangengift konnten nach wie vor Kinine freigesetzt werden, dagegen war das reduzierte und alkylierte Molekül für die spezifischen Kininogenasen (Schweine-Pankreas-Kallikrein) nicht mehr zugänglich (67).

Zur Aufklärung der Aminosäuresequenz wurden peptische, kininliefernde Fragmente näher untersucht (68,69,70,71,72). Aus gereinigtem Kininogen isolierten HABERMANN und Mitarbeiter zwei peptische Fragmente, die nach ihrem papierelektrophoretischen Verhalten PKFL (= langsam wanderndes peptisches kininlieferndes Fragment) und PKFS (= schnell wanderndes peptisches kininlieferndes Fragment) genannt wurden. Die Strukturaufklärung ergab folgende Sequenz:

PKFL Met-Lys-Bradykinin-Ser-Val-Glu

PKFS Met-Lys-Bradykinin-Ser-Val-Glu-Val-Met

(73,74,75,76,77)

Nach Einwirken von Bromcyanid fanden HABERMANN und HELBIG (78,79) zwei Peptide mit folgender Struktur:

Lys-Bradykinin-Ser-Val-Glu-Val-hoSer

Lys-Bradykinin-Ser-Val-Glu-Val-hoSerLacton

Dadurch wurde die Sequenz der peptischen kininliefernden Fragmente (PKF) bestätigt. KATO und SUZUKI (80) konnten die Ergebnisse bestätigen.

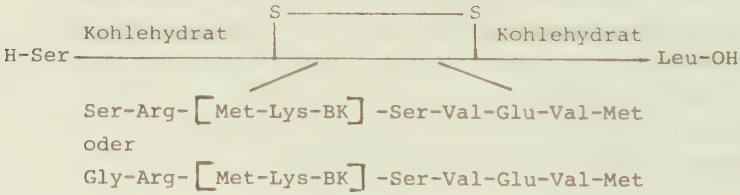
Peptische kininliefernde Peptide wurden auch von HOCHSTRASSER und WERLE (81) aus der Fraktion IV-6 von Rinderblut dargestellt. Sie fanden zwei Peptide mit folgender Sequenz:

Ser-Arg-Met-Lys-Bradykinin

Gly-Arg-Met-Lys-Bradykinin

Die Diskrepanz zu HABERMANNS peptischen Fragmenten kann vielleicht durch Unterschiede im Ausgangsmaterial und in der Technik der Präparation erklärt werden.

Für LMW-Rinder-Kininogen kann folgendes Strukturmodell vorgeschlagen werden (46):



## 2.2.2. HMW-Rinder-Kininogen

Trypsin, Schlangengift und Organkallikreine setzen aus LMW-Rinder-Kininogen sehr schnell Kinine frei.Mit Plasmakallikrein werden dagegen nur sehr langsam Kinine freigesetzt, bei kurzer Inkubationszeit sind kaum Kinine nachzuweisen (82,83). Die Tatsache, daß aus einer erhitzten Pseudoglobulinfraktion mit Plasmakallikrein eine Kininfreisetzung zu erzielen war, legte die Vermutung nahe, daß ein zweites Kininogen existiert, das spezifischer für Plasmakallikrein ist. Tatsächlich konnte durch Gel-Filtration einer erhitzten Pseudoglobulinfraktion mit Sephadex G-150 ein zweites Kininogen abgetrennt werden, das höher molekular war und gut mit Plasmakallikrein reagierte (84). HMW-Kininogen wurde zunächst von YANO (83) aus mit o-Phenanthrolin und EDTA stabilisiertem Plasma durch Chromatographie mit DEAE-Sephadex A-50, Erhitzen auf 70 $^{o}$C und Chromatographie mit CM-Sephadex C-50 isoliert. Elektrophoretisch wanderte das HMW-Kininogen gleich wie die dimere Form des LMW-Kininogens. Bei der Chromatographie an CM-Sephadex C-50 zeigten beide Formen jedoch unterschiedliche Affinitäten, so daß ausgeschlossen werden konnte, daß die HMW-Kininogen-Präparation mit dimerem LMW-Kininogen kontaminiert war.

Später wurde der Isolierungsvorgang für HMW-Kininogen nach folgendem Schema angewandelt (85,86):

Methode nach KOMIYA 1974 (85,86)

Ausgangsmaterial ist EDTA-Plasma.

1. DEAE-Sephadex A-50 (0,02 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5, 0,1 M NaCl, Elution mit 0,2 M Acetatpuffer pH 6,2, 0,6 M NaCl)
2. CM-Sephadex C-50 (0,05 M Acetat-Puffer pH 6,2, linearer NaCl-Gradient 0,25 M – 0,8 M, Hexadimethrinbromid, 4 °C)
3. Bio-Gel P-300 (0,05 M Acetat-Puffer pH 6,2, 0,2 M NaCl, Diisopropylfluorphosphat, 4 °C)

⟶ HMW-Kininogen (spez. Aktivität 14,2 µg/mg Protein)

Die beiden ersten Reinigungsschritte sind mit der Isolierung von LMW-Kininogen identisch.

Da HMW-Kininogen von Plasmakallikrein sehr gut gespalten wird, ergaben sich bei der Isolierung große Schwierigkeiten. Durch Zusatz von Inhibitoren [Polybrene$^R$ = Hexadimethrinbromid (HF-Inhibitor) und Diisopropylfluorphosphat (Kallikrein-Inhibitor)] konnte eine Kininfreisetzung aus HMW-Kininogen während des Isolierungsvorganges weitgehend verhindert werden (86).

HMW-Kininogen unterscheidet sich in wesentlichen Punkten von LMW-Kininogen. Das Molekulargewicht wurde durch Gleichgewichtszentrifugation ($S_{20/w}$ = 3,8, partielles spezifisches Volumen = 0,718 ml/g) zu 76.000 bestimmt. Der isoelektrische Punkt lag bei pH 4,5 und ist damit höher als beim LMW-Kininogen (pI = 3,3). In deionisiertem Wasser ist HMW-Kininogen unlöslich, LMW-Kininogen dagegen ist löslich. Elektrophoretisch wanderte HMW-Kininogen langsamer als LMW-Kininogen (63,86). Die unterschiedliche Substratfunktion beider Kininogenen ist deutlich. Mit Trypsin, Schlangengift,

Plasmin und Organkallikrein reagierten beide Formen etwa gleich gut. Mit Plasmakallikrein dagegen reagierte nur HMW-Kininogen gut, LMW-Kininogen dagegen nur sehr langsam. Bei der Inkubation äquipotenter Kininogenlösungen mit der gleichen Enzymmenge wurde nach einer Stunde Inkubationsdauer aus HMW-Kininogen 5,0 µg Bradykinin/Probe freigesetzt, aus LMW-Kininogen nur 0,13 µg Bradykinin/Probe (83).

Der chemische Aufbau beider Glycoproteine weist Gemeinsamkeiten auf (63). HMW-Kininogen und LMW-Kininogen reagierten mit Antikörpern gegen HMW- und LMW-Kininogen kreuz, die determinanten Gruppen beider Kininogene scheinen identisch zu sein. Auch die Aminosäuresequenz der durch Einwirken von Bromcyan erhaltenen kininliefernden Fragmente ist identisch. Das Peptidmuster beider Proteine, das nach tryptischer Verdauung mittels zweidimensionaler Papierelektrophorese dargestellt wurde, ist sehr ähnlich. HMW-Kininogen lieferte 43 Peptide, LMW-Kininogen 30 Peptide. 28 Peptide waren beiden Kininogenen gemeinsam (63,86).

Die Aminosäurezusammensetzung ist ebenfalls nicht sehr unterschiedlich. Der Gehalt von vier Aminosäuren und der Kohlehydratanteil differieren etwas (63,86).

| | HMW-Kininogen | | LMW-Kininogen | |
|---|---|---|---|---|
| | % | Mole/Mol Protein | % | Mole/Mol Protein |
| Histidin | 5,0 | 28,3 | 2,29 | 8,3 |
| Lysin | 7,05 | 42,7 | 5,47 | 21,6 |
| Valin | 4,88 | 38,2 | 5,91 | 30,4 |
| Alanin | 2,85 | 31,1 | 3,82 | 27,2 |
| Kohlehydrat gesamt | 12,6 | | 19,8 | |
| Galactose | 3,02 | | 4,9 | |
| Mannose | 1,55 | | 2,5 | |
| Glucosamin | 2,12 | | 6,7 | |
| Galactosamin | 1,53 | | 0 | |
| Neuraminsäure | 4,35 | | 5,7 | |

Tab. 5: Aminosäure- und Kohlehydratzusammensetzung von HMW-Kininogen und LMW-Kininogen (Rind).

HMW-Kininogen enthält wesentlich weniger Kohlehydrate als LMW-Kininogen, darunter auch Galactosamin, das in LMW-Kininogen nicht vorkommt.

HMW-Kininogen erwies sich bei der Disk-Elektrophorese als heterogen. Es wurden zwei Proteinbanden, die beide bei der Inkubation mit Plasmakallikrein Kinine freisetzten, gefunden. Die beiden Komponenten waren teilweise mittels Chromatographie an CM-Sephadex C-50 zu trennen. Durch Endgruppenbestimmungen, Inkubation mit Bromcyan und Carboxypeptidase, Reduktion und anschließende Elektrophorese konnte folgender Sachverhalt festgestellt werden (85,87): HMW-Kininogen setzt sich aus zwei Komponenten, Kininogen-a und Kininogen-b, zusammen.

Kininogen-b besteht aus einer Polypeptidkette mit Leucin als C-terminaler Aminosäure, die N-terminale Aminosäure ist mit -Acetyl maskiert. Die Kininsequenz liegt innerhalb der Kette, die durch Disulfidbrücken vernetzt ist. Kininogen-a ist chemisch mit Kininogen-b identisch, nur besitzt es eine Bruchstelle hinter der Bradykinin-Sequenz im Molekül.

Strukturvorschlag für HMW-Kininogen-a und -b (87):

Kininogen-b

Kininogen-a

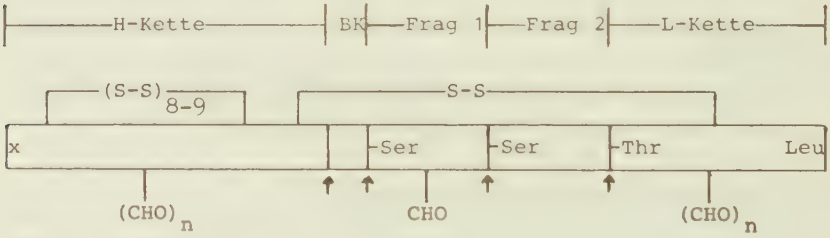
x = maskierte N-terminale Aminosäure

Die Inkubation von HMW-Kininogen mit Plasmakallikrein liefert noch zwei weitere Peptide. Die Struktur dieser Peptide, genannt Fragment 1 und Fragment 2, wurde vollständig aufgeklärt und im Kininogenmolekül lokalisiert (88,89). Fragment 2 besteht aus 41 Aminosäuren mit N-terminalem Serin und C-terminalem Arginin. Auffällig ist der extrem hohe Gehalt an Histidin (deshalb auch "Histidine-rich-polypeptide" genannt) und wiederholte Sequenzen vom Typ His-Gly-X oder Gly-His-X.

Fragment 1 besteht aus 69 Aminosäuren und einer Oligosaccharidkette, die Galaktosamin, Galaktose und Neuraminsäure enthält. Die Sequenz His-Gly-X findet sich auch in diesem Fragment. Beide Fragmente sind anschließend an die C-terminale Aminosäure der Kininsequenz lokalisiert.

Das kininfreie Kininogen (d.h. nach Abspaltung von Kinin, Fragment 1 und 2) besteht aus einer H-Kette (MG = 48.500) und einer L-Kette (MG = 16.000), die durch eine einzelne S-S-Brücke verbunden sind (90). Im C-terminalen Anteil des Gesamtmoleküls (L-Kette, Fragment 1 und 2) ist in den Kohlehydratseitenketten Galaktosamin enthalten, im N-terminalen Anteil (= H-Kette) dagegen ist Glucosamin enthalten.

Nach diesen Befunden wurde folgendes Modell der Primärstruktur von HMW-Kininogen aufgestellt (90):




x = maskierte N-terminale Aminosäure

↑ = Angriffspunkte von Plasmakallikrein

## 2.3. Pferde-Kininogen

HENRIQUES et al. (91,92) erhielten nach Behandlung von erhitztem Pferdeplasma mit Ammoniumsulfat und anschließender Chromatographie an DEAE-Sephadex zwei verschiedene Kininogene. Kininogen I diente als Substrat für Schlangengift, Trypsin und Plasmakallikrein, Kininogen II reagierte ebenfalls mit Schlangengift, Trypsin, Plasmin und Nierenkallikrein, jedoch nicht mit Plasmakallikrein. Mit Trypsin als Kininogenase wurde eine spezifische Aktivität von 3,1 µg Bradykinin/mg Protein gefunden, mit Schlangengift 5,0 µg Bradykinin/mg Protein. Weitere Eigenschaften wurden nicht beschrieben.

## 2.4. Kaninchen-Kininogen

Kaninchen-Kininogen wurde von EGOROVA und PASKHINA (93,94) isoliert. Die spezifische Aktivität betrug 22 µg Bradykinin/mg Protein. Die Sedimentationskonstante $S_{20/w}$ = 3,3 ergab ein Molekulargewicht um 48.000. Auch dieses Kininogen ist ein Glykoprotein mit einem Kohlehydratanteil von 15,2 %. Durch die Enzyme Trypsin, Kaninchen-Plasmakallikrein und menschliches Organkallikrein konnten aus dem nativen Molekül Kinine freigesetzt werden. Nach Erhitzen des Kininogens war mit Kallikreinen keine Kininfreisetzung mehr möglich. Auch bei diesem Kininogen scheint wie bei Rinder-Kininogen die Kettenkonformation für den Abbau durch Kallikreine von Bedeutung zu sein (67).

Von COCHRANE und WUEPPER (52,53) wurde ebenfalls ein Kaninchen-Kininogen isoliert. Das Molekulargewicht wurde aus $S_{20/w}$ = 3,8 und $D_{20/w}$ = 4,7 zu 79.000 berechnet, der iso-

elektrische Punkt betrug 5,1 - 5,2. Mit Trypsin, Plasmakallikrein und menschlichem Nierenkallikrein konnten aus diesem Kininogen Kinine freigesetzt werden.

## 2.5. Andere Kininogene

JACOBSEN (17,95) konnte die Existenz von zwei verschiedenen Kininogenen im Ratten-, Kaninchen-, Meerschweinchen- und Hundeplasma nachweisen. Sie unterschieden sich im Molekulargewicht und in der Substratspezifität gegenüber Enzymen.

# III. PHYSIOLOGIE

## 1. Vorkommen

Kininogen kommt hauptsächlich im Blutplasma vor. Die von verschiedenen Autoren bestimmten Normalwerte differieren beträchtlich, was hauptsächlich auf die Unterschiede in der Bestimmungsmethode (Reaktionsbedingungen und verwendete Kininogenase) zurückzuführen ist.

Die folgende Tabelle enthält eine Zusammenstellung von Kininogenwerten des menschlichen Plasmas, die von verschiedenen Autoren beschrieben wurden.

| Autor | Mittelwert | Bereich |
|---|---|---|
| | µg Bradykininäquivalente/ml Plasma | |
| BROCKLEHURST und ZEITLIN 1967 (29) | 6,1 | 5,1 - 7,3 |
| DINIZ 1967 (96) | 9,3 | 6,5 -12,6 |
| MOURI 1969 (97) | 5,63 | 4,1 - 6,9 |
| PERITI und GASPARRI 1966 (98) | 2,77 | 1,67- 3,87 |
| MARGOLIS 1966 (99) | ca.4,0 | |
| ROCHA E SILVA 1963 (100) | | 10 - 15 |
| TRAUTSCHOLD 1966 (101) | | 15 - 20 |

Tab. 6: Normalwerte für Kininogen (Mensch)

SICUTERI (102) beschrieb erhebliche arterio-venöse Differenzen von 0,2 - 1,0 µg Bradykinin/ml bei einem Mittelwert von 3,4 µg Bradykinin/ml arteriell und 2,8 µg Bradykinin/ml venös. Auch SCHARNAGEL und GREEFF (103) fanden beim Hund arteriovenöse Differenzen (12,4 µg Bradykinin/ml / 11,3 µg Bradykinin/ml), die sich nach elektrisch ausgelöster Muskeltätigkeit beträcht-

lich vergrößerten (10,2 µg Bradykinin/ml / 5,3 µg Bradykinin/ml).

Die ersten vergleichenden Werte über den Kininogengehalt im Plasma verschiedener Tiere stammen von DINIZ und CARVALHO (19).

| | Mittelwert | Bereich |
|---|---|---|
| | µg Bradykininäquivalente/ml Plasma | |
| Rind | 14,5 | 11,9 - 17,0 |
| Pferd | 9,5 | 8,8 - 9,9 |
| Schaf | 6,4 | 6,0 - 6,9 |
| Hund | 6,0 | 4,7 - 8,2 |
| Katze | 8,7 | |
| Kaninchen | 11,1 | 8,3 - 11,6 |
| Meerschweinchen | 8,9 | 7,9 - 10,0 |
| Ratte | 2,0 | 1,3 - 2,5 |
| Taube | 1,2 | 1,1 - 1,3 |
| Huhn | Spuren | |

Tab. 7: Kininogengehalt im Plasma verschiedener Tiere nach DINIZ und CARVALHO 1963 (19).

Vögel besitzen eine andere Kininvorstufe als Säugetiere, das Ornitho-Kininogen, ein Teil des Ornitho-Kininsystems (104).

Auch in den Geweben findet sich Kininogen, jedoch in wesentlich geringerer Konzentration als im Blutplasma. WERLE und ZACH (33) untersuchten bei Ratten und einigen anderen Säugetieren den Kininogengehalt von verschiedenen Organen. Unter Berücksichtigung des Blutgehaltes der Organe fanden sie den höchsten Kininogengehalt in der Lunge, gefolgt von Niere, Haut und Herz. SARDESAI (105), der als Ausgangsmaterial Acetontrockenpulver verwendete, fand bei Kaninchen, Rind, Schwein und Schaf die höchsten Kininogenwerte im Herzmuskel. Danach

folgten Leber und Niere, wobei die Werte für die Leber etwa doppelt so hoch lagen wie für die Niere. Im Gegensatz dazu war bei WERLE und ZACH (33) der Kininogengehalt der Niere meist höher als der der Leber.

Außer im Blutplasma wurde Kininogen auch in anderen Körperflüssigkeiten nachgewiesen, von SCHACHTER (106) im Ductus thoracicus, von JACOBSEN (107) in der Lymphe der Hinterläufe von Hunden und Kaninchen und von GEIGER et al. im Magensaft nach Stimulation mit Pentagastrin (108). Colostrum von Mensch, Kuh, Ziege und Hund enthält ein Kininogen in Konzentrationen, die ungefähr denen des Plasmas entsprechen. Durch Trypsin und Organkallikrein, nicht jedoch durch Plasmakallikrein, wird es in das sogenannte Colostrokinin übergeführt (109).

Der Nachweis von Kininogen im Liquor ist nicht eindeutig gelungen (110,111). SICUTERI (112) fand in normalen Liquor nur Spuren von Kininogen.

Umsatzstudien mittels radioaktiv markiertem Kininogen bei Kaninchen ergaben eine Halbwertszeit von ungefähr einem Tag (31). Die Resynthese von Kininogen erfordert ca. 24 Stunden (113,114,115).

Als Ort der Kininogensynthese wird die Leber vermutet. DINIZ und CÂRVALHO (19) fanden bei Kaninchen nach partieller Hepatektomie bzw. Vergiftung mit $CCl_4$ einen starken Abfall des Plasmakininogenspiegels. Patienten mit Lebercirrhose und Fettleber wiesen einen deutlich erniedrigten Plasmakininogengehalt auf. LUKJAN et al (116) führten den erniedrigten Kininogenspiegel bei Patienten mit Lebercirrhose zumindest teilweise auf einen erhöhten Kininogenverbrauch zurück, verursacht durch die bei Lebercirrhose gesteigerte fibrinolytische Aktivität.

Hinweise auf die Leber als Bildungsort ergaben auch die Untersuchungen von BRYAN et al (117), die die isolierte Rattenleber mit einer $^{14}C$-Arginin und $^{14}C$-Prolin enthaltenden Lösung perfundierten und die Bildung von radioaktivem Kininogen nachweisen konnten.

BORGES und GORDON (118) perfundierten ebenfalls die isolierte Leber von Ratten und fanden bei Tieren, die zuvor durch subcutane Injektion von Terpentinöl stimuliert worden waren, eine doppelt so hohe Kininogenmenge im Perfusat.

## 2. Physiologische Funktion

Die pharmakologischen Wirkungen der Kinine führten zu der Annahme ihrer Mitwirkung an der Regelung verschiedener physiologischer Funktionsabläufe.
Kininogen, die inaktive Vorstufe der biologisch wirksamen Kinine, ist deshalb von besonderem Interesse, weil Kinine schnell inaktiviert werden und der Nachweis schwierig ist. Es wurde deshalb häufig versucht, aus Änderungen des Kininogenspiegels auf eine Aktivierung des Kininsystems zu schließen.

### 2.1. Wirkung der Kinine

Kinine sind pharmakologisch hoch wirksame Stoffe, die schon in sehr geringer Konzentration Vasodilatation, erhöhte Kapillarpermeabilität, Kontraktion oder Erschlaffung glattmuskulärer Organe und Schmerzempfindung hervorrufen (siehe 119,120,121). Die drei wichtigsten Kinine Bradykinin ( 9 Aminosäuren), Kallidin (10 Aminosäuren) und Met-Lys-Bradykinin (11 Aminosäuren) unterscheiden sich in ihrer pharmakologischen Wirkung so, daß mit zunehmender Molekülgröße der Effekt auf Blutdruck und Gefäßpermeabilität zunimmt, umge-

kehrt ist die Wirkung auf glattmuskuläre Organe am größten bei Bradykinin und nimmt mit zunehmender Molekülgröße ab (122).

Arteriolen und Präkapillaren von Muskulatur, Niere, Darm und verschiedenen Drüsen sowie Coronar- und Gehirngefäße werden durch die Kinine erweitert, die Venolen, insbesondere die der Lunge, werden dagegen verengt. Daraus resultiert ein Abfall sowohl des systolischen als auch des diastolischen Blutdruckes, sowie reflektorisch ein Anstieg von Herzfrequenz und Schlagvolumen. Hohe Kinindosen steigern die Sekretion des Nebennierenmarks (123) durch direkten Angriff an den chromaffinen Zellen (124).

Kinine erhöhen die Permabilität der kleinen Venolen und Kapillaren. Im Vergleich zu Histamin sind die Kinine 15 mal wirksamer (125,126,127).

Die konstriktorische Wirkung auf isolierte glattmuskuläre Organe zeigt sich am deutlichsten am Rattenuterus. Die charakteristisch langsame Reaktion des Meerschweinchenileums prägte den Namen Bradykinin. Am Rattenduodenum wirken die Kinine relaxierend. Weder durch Ganglienblocker noch durch Atropin läßt sich der Effekt auf die glatte Muskulatur aufheben. Die bronchokonstriktorische Wirkung der Kinine wird durch antiinflammatorische Substanzen wie Aspirin selektiv geblockt (128,120). Die schmerzerzeugende Wirkung der Kinine wird ebenfalls durch Aspirin gehemmt.

Neuere Befunde zeigen eine Wechselwirkung zwischen Kininen und Prostaglandinen. Bradykinin stimuliert die Synthese von Prostaglandinen (129,130,131). Prostaglandine ihrerseits potenzieren die schmerzerzeugende und permeabilitätserhöhende Wirkung von Bradykinin (132,133,134,135). Die antagonistische Wirkung von entzündungshemmenden Substanzen wie Aspirin gegenüber Kininen könnte über eine Hemmung der Prostaglandin-Synthese erklärt werden, da diese Substanzen als Inhibitoren der Prostaglandin-Synthetase bekannt sind.

ROCHA E SILVA (136), der die Wirkung von Bradykinin und Prostaglandinen am isolierten Meerschweinchenherz untersuchte, postulierte die Möglichkeit, daß Prostaglandine Bradykinin aus Kininogen freisetzen.

Kinine beeinflussen auch den Neurotransmitter-Gehalt des Gehirns (137,138) und wirken wahrscheinlich selbst als Neurotransmitter (139,140).

Außer den beschriebenen schon länger bekannten Wirkungen der Kinine wurde in den letzten Jahren ein Einfluß der Kinine auf die Proliferation von Zellen (141,142) und auf resorptive Vorgänge der Zelle (143,144,145) beschrieben.

## 2.2. Muskel- und Hautdurchblutung

Es wird vermutet, daß die funktionelle Gefäßerweiterung in Haut und Muskulatur durch Kinine zustande kommt. SCHARNAGEL und GREEFF (103) bestimmten in diesem Zusammenhang venöse und arterielle Kininogenspiegel bei Hunden. Sie fanden nach Muskelkontraktionen durch rhythmische Reizung des N. ischiadicus eine Abnahme des Kininogengehaltes im venösen Blut. Temporäre Abschnürung der hinteren Extremität führte ebenfalls zu einem Absinken des venösen Kininogengehaltes. Hypoxie verursachte eine Verminderung des Kininogens sowohl im venösen als auch im arteriellen Blut. Auf Grund dieser Befunde wird von den Autoren eine Beteiligung des Kallikrein-Kinin-Systems an der Durchblutungsregulation angenommen.
BAVAZZANO (146) berichtete ebenfalls über erniedrigte Plasmakininogenspiegel bei lokaler Ischämie.

Auch wird eine Beteiligung des Kallikrein-Kinin-Systems bei der Wärmeregulation angenommen; so konnten GREEFF und SCHARNAGEL (147) bei Ratten zeigen, daß eine Erhöhung der Umgebungstemperatur auf 40 $^{o}$C den Plasmakininogengehalt senkte.

## 2.3. Schwangerschaft

Verschiedene Autoren beschrieben einen im Verlauf der Schwangerschaft ansteigenden Plasmakininogenspiegel (98,148,149, 150), der während der Entbindung stark abfällt (151,152,19,148, 98).

WIEGERSHAUSEN (153) konnte ein ähnliches Verhalten des Kininogenspiegels bei Ratten und Kaninchen zeigen. MC CORMICK und SENIOR untersuchten bei Ratten den Zusammenhang zwischen Geschlechtshormonen und Kininogenspiegel. Oestrogen-

applikation führt zu einem Anstieg des Kininogenspiegels und zu einer Abnahme der Kininase-Aktivität; Progesteron bewirkt erst in hohen Dosen eine Senkung des Kininogenspiegels. Entscheidend für die Veränderung des Plasma-Kininogengehaltes während der Schwangerschaft scheint das Verhältnis Östrogen/Progesteron zu sein (154,155,156,157, 158,159).

PRASAD (160) bestimmte den Kininogenspiegel bei Ziegen im Verlauf des Menstruationszyklus. Er fand mit Beginn der Menstruation einen Abfall des Kininogengehaltes, ab dem 6. Zyklustag einen Wiederanstieg. Der höchste Wert wurde vor Beginn der Menstruation erreicht.

## 2.4. Exkretorische Drüsen

HILTON und LEWIS vermuteten, daß die Mehrdurchblutung der Speicheldrüsen bei funktioneller Beanspruchung durch das in diesen Drüsen gebildete Kallikrein bedingt ist. Kallikrein soll dabei aus dem in der interstitiellen Flüssigkeit vorhandenen Kininogen das gefäßerweiternde Kallidin freisetzen (161,162,163,164). Nach Reizung der Chorda tympani kommt es bei der Katze zu einem Abfall des LMW-Kininogens (165).

Diese Auffassung wird jedoch von anderen Arbeitsgruppen angezweifelt (166,167,168,169,170).

## 2.5. Niere

Von der gesunden Niere werden regelmäßig Kallikrein und Kinine in den Harn ausgeschieden. Das Kinin des Harns stammt nicht aus dem Blutkreislauf, da in die A. renalis injiziertes Kinin nicht im Harn erscheint (171,172). Nach bilate-

raler Nephrektomie steigt der Kininogenspiegel des Blutes bei Ratten innerhalb von 24 Stunden auf den dreifachen Wert an, Präkallikrein und Kininaseaktivität bleiben unverändert (173). Der Anstieg des Kininogenspiegels nach Nephrektomie ist signifikant höher als der Kininogenspiegel bei Ratten, die verschiedenen anderen Operationstraumen ausgesetzt worden waren (174,175).

Es scheint, daß die Niere ständig Kininogen aus dem Blut verbraucht. Erhöhte Kininogenkonzentration im Blut sowie Salyrgangaben steigern die Kininausscheidung (176).

## 2.6. Genitaltrakt

Bei in vitro Versuchen mit Ejaculaten von Patienten mit Asthenozoospermie konnten SCHILL und HABERLAND (177) zeigen, daß das Kallikrein-Kininsystem eine wichtige Rolle bei der Spermatozoenmotilität spielt. Durch Zufuhr von Kallikrein, Bradykinin und Kininogen wurde jeweils eine signifikante Motilitätssteigerung erreicht, durch Zufuhr von Carboxypeptidase B als Kininase war eine Motilitätseinschränkung zu beobachten.

Daß Kininogen im Seminalplasma vorhanden ist, wurde indirekt daraus geschlossen, daß durch hochgereinigtes Kallikrein die Spermatozoenmotilität stimuliert wurde, andererseits eine Wirkungsverstärkung von Kallikrein durch Zufuhr von Kininogen in Form von Humanserum erreicht wurde.

## 2.7. Gerinnung und Fibrinolyse

Die zentrale Rolle des Hageman-Faktors bei der durch Oberflächenkontakt ausgelösten Gerinnung und Fibrinolyse sowie seine Verbindung zum Kallikrein-Kinin-System ist seit langem bekannt (178,179,180). Die Ergebnisse der letzten Jahre haben gezeigt, daß HMW-Kininogen bei dieser Aktivierung eine wichtige Rolle spielt.

1965 wurde bei Patienten der FLETCHER-Faktor-Mangel entdeckt, ein Gerinnungsdefekt, bei dem nach Aktivierung weder Plasmin noch Kinine gebildet werden (181). Der FLETCHER-Faktor wurde als Präkallikrein identifiziert (182,183,184, 185).

Kallikrein ist also nicht nur ein Intermediär-Produkt des kininbildenden Systems, sondern spielt als Verstärkersubstanz eine bedeutende Rolle bei Gerinnung und Fibrinolyse, indem es, zunächst durch den aktivierten Hageman-Faktor aus Präkallikrein gebildet, seinerseits wiederum den Hageman-Faktor aktiviert (183,186,187).

SCHIFFMAN und LEE (188) zeigten, daß außer dem Hageman-Faktor, Präkallikrein und Prä-PTA noch ein weiterer Faktor, den sie "contact activation co-factor" (CAC) nannten, für die Bildung von Faktor XI notwendig ist. Die Entdeckung der FITZGERALD-Faktor-Mangels (siehe Pathophysiologie), ein erblicher Kininogen-Mangel, der sich ähnlich wie der FLETCHER-Faktor-Mangel in etwas verlängerten Gerinnungszeiten und in einem gestörten Ablauf der Fibrinolyse manifestiert, zeigte, daß auch HMW-Kininogen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung spielt. HMW-Kininogen ist mit dem sogenannten "contact-activation co-factor" identisch (189).

Der Angriffspunkt von HMW-Kininogen ist der hageman-Faktor und/oder die Hageman-Faktor-Fragmente (190,191). REVAK et

al. (192) fanden eine durch HMW-Kininogen beschleunigte Spaltung von radioaktiv markiertem Hageman-Faktor in seine Fragmente. GRIFFIN und COCHRANE (193) vermuten die Bildung eines 1:1 Komplexes zwischen HMW-Kininogen und Hageman-Faktor bzw. HMW-Kininogen und aktiviertem Hageman-Faktor und eine daraus resultierende Potenzierung der proteolytischen Wirkung des Hageman-Faktors.

WALDMANN et al. (194) untersuchten HMW-Rinder-Kininogen und die durch Kallikrein daraus freigesetzten Peptide (siehe Kap. II) auf ihre Fähigkeit, den FITZGERALD-Faktor-Mangel zu korrigieren. Kininfreies Kininogen besaß nur 30 % der Potenz von intaktem Kininogen. Bemerkenswerterweise zeigte Fragment 2 (= Histidine-rich-fragment) einen inhibitorischen Einfluß auf den Hageman-Faktor und scheint damit Teil einer negativen Rückkopplung zu sein.

# IV. PATHOPHYSIOLOGIE

## 1. Entzündung und Gewebsschädigung

Die vier Kardinalsymptome der Entzündung - dolor, rubor, tumor, calor - entsprechen den pharmakologischen Wirkungen der Kinine. Eine Beteiligung des Kallikrein-Kinin-Systems an Entzündungsvorgängen wurde von vielen Autoren untersucht.

Nach Gewebsschädigungen verschiedenster Art bei Ratten (z.B. Injektion von entzündungsauslösenden Substanzen wie Krotonöl, thermische Schädigung, chirurgische Eingriffe) zeigt der Plasmakininogenspiegel ein charakteristisches Verhalten (195,175).

Nach einer Latenzzeit von ca. 10 Stunden steigt er um den 2-3 fachen Wert an, um im Verlauf der Heilung wieder auf Normalwerte abzusinken. Die Veränderungen des Kininogenspiegels korrelieren mit einer Vermehrung der $\alpha$-Globuline und einer Verminderung der Albumine. Das Ausmaß der Erhöhung des Kininogenspiegels ist der Größe und Dauer der Gewebsschädigung proportional. Durch Antiphlogistica kann die entzündliche Reaktion abgeschwächt werden, nicht aber die Kininogenzunahme.

Die entzündungsauslösenden Substanzen im Krotonöl sind Phorbolderivate mit entzündlicher und kokarzinogener Wirkung, die eine signifikant höhere Kininogen- und $\alpha$-Globulinzunahme auslösen als Phorbolderivate mit nur entzündlicher Wirkung. Der Anstieg des Kininogens scheint weniger von der entzündlichen Reaktion als vom Ausmaß der Zellschädigung abzuhängen. Präkallikreingehalt und Kininaseaktivität des Plasmas bleiben jedoch unverändert.

REICHENBACH-KLINKE et al. (196) untersuchten den Kininogenspiegel von Mäusen nach Ganzkörperbestrahlung und lokaler Hautexcision. Die Kombination beider Schäden führte zu einer Steigerung der Kininogenkonzentration um 100 % der Ausgangswerte. Andere Autoren beobachteten ebenso erhöhte Plasmakininogenspiegel nach Röntgenbestrahlung bei Ratten (197,198).

Bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen wird eine Beteiligung des Kallikrein-Kinin-Systems diskutiert, so vor allem bei der Pankreatitis , bei der Gicht und bei der akuten Hepatitis.

Die Rolle des Kallikrein-Kininsystems bei der Pankreatitis und insbesondere die Wirksamkeit von Trasylol$^{R}$ als Therapeutikum war lange umstritten (Übersicht s. 199, 200). Eine Abnahme des Plasmakininogenspiegels im Schockstadium der akuten Pankreatitis wurde von mehreren Autoren nachgewiesen (201,202,203,204,205,206,207,208) und als indirekter Beweis für die Beteiligung der Kinine an der Ausbildung des Kreislaufschocks gewertet.

Bei Gichtkrankheiten wurden Kinine in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen (209). KELLERMEYER und BRECKENRIDGE (210) und EISEN und KEELE (211) konnten zeigen, daß der Hageman-Faktor, der ebenfalls in der Synovialflüssigkeit vorkommt (212), durch Urat-Kristalle aktiviert wird. Da der Kininogenspiegel in Gelenkflüssigkeit hoch ist (211), kann eine Kininbildung nach der Hageman-Faktor-Aktivierung durch Uratkristalle angenommen werden.

Bei der Virus-Hepatitis konnten DEL BIANCO et al. (213) keine Veränderung des Plasmakininogenspiegels nachweisen. NEUMAYR et al. (214) jedoch fanden bei Patienten mit akuter Hepatitis einen deutlichen Kininogenabfall, der sich mit zunehmender Normalisierung der Leberfunktion wieder zurückbildete.

Die Bedeutung des Kininsystems bei der Protozoenerkrankung Malaria wurde von verschiedenen Autoren untersucht. Bei infizierten Rhesusaffen fiel der Plasmakininogenspiegel stark ab, während gleichzeitig eine gesteigerte Kininaseaktivität zu beobachten war (215,216). Bei infizierten Mäusen war Kininogen bezogen auf den Proteingehalt des Plasmas nur in den schweren Fällen erniedrigt. Bei diesen Tieren wurde auch vermehrt freies Kinin im venösen Blut gefunden (217).

Während chirurgischer Eingriffe beim Menschen bestimmte AARON (218) fortlaufend Präkallikrein- und Kininogenspiegel. Bereits 2 Stunden nach Beginn der Eingriffe sank der Präkallikrein- und Kininogenspiegel ab und erreichte am zweiten postoperativen Tag 60 % der Ausgangswerte. Danach erfolgte eine rasche Rückkehr zu den Normalwerten und ein unterschiedlich stark ausgeprägter weiterer Anstieg. Das Verhalten des Plasmaproteinspiegels wurde nicht untersucht.

## 2. Immunologische Erkrankungen

Im Verlauf von Antigen-Antikörper-Reaktionen wird das Kallikrein-Kinin-System aktiviert (219,220). Bei verschiedenen Erkrankungen, die aus pathogenen Immunreaktionen entstehen, wurde die Rolle des Kallikrein-Kinin-Systems untersucht.

KALLEN und LEE (221) fanden bei Kindern mit idiopathischem nephrotischem Syndrom während der akuten Phase erniedrigte Präkallikrein- und Kallikrein-Inhibitorspiegel im Plasma, die sich während der Remissionsphase normalisierten. Die Autoren postulierten, daß Kinine für die Entstehung der erhöhten glomerulären Kapillarpermeabilität für Plasmaproteine, die kennzeichnend ist für das nephrotische Syndrom, verantwortlich sind.

Von MELMON et al. (209) wurden Kinine in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis nachgewie-

sen. ZEITLIN et al. (222) fanden bei unbehandelten Rheumapatienten einen mehr als doppelt so hohen Kininogenspiegel im Vergleich zu Normalpersonen.

Kininogen kommt in der Muskulatur des Colon vor, Kallikrein und Präkallikrein dagegen finden sich nur in der Mucosa. Bei Patienten mit Colitis ulcerosa sind im akuten Stadium auch in der Muskulatur hohe Kallikreinspiegel vorhanden, eine Aktivierung des Kallikrein-Kininsystems ist somit möglich (223).

Auch das Bronchialasthma gehört zu den Erkrankungen, bei deren Pathogenese Kinine wahrscheinlich von Bedeutung sind (224,225,226,227).

## 3. Schock

Der akute Blutdruckabfall bei verschiedenen Schockformen wurde schon bald nach der Entdeckung von Bradykinin mit einer Aktivierung des Kininsystems in Zusammenhang gebracht (228, 229,230). Beim experimentellen Schock wurde vor allem das Verhalten des Plasmakininogenspiegels als indirekter Beweis für eine Beteiligung der Kinine untersucht, da die Erfassung der aktiven Komponenten des Systems wegen ihrer raschen Inaktivierung erschwert ist.

### 3.1. Hypovolämischer Schock

Das tierexperimentelle Standardmodell des hypovolämischen Schocks ist der hämorrhagische Schock durch arteriellen Blutentzug.

Bei dieser Schockform wurde ein unterschiedliches Verhalten des Plasmakininogenspiegels gefunden. DINIZ und CARVALHO (19) beobachteten bei Hunden einen biphasischen Verlauf

des Kininogenspiegels, nämlich zunächst einen Anstieg auf 160 %, danach einen Abfall auf ungefähr 60 % des Ausgangswertes. MEYER (231) berichtete über eine Verminderung des Kininogens von 14 µg/ml Plasma auf 5 µg/ml Plasma beim hämorrhagischen Schock des Hundes; STARR und WEST (232) dagegen fanden bei der Ratte einen Kininogenanstieg. Einen simultanen Abfall von Kininogen und totalem Proteingehalt des Plasmas konnten URBANITZ et al. (233) bei Hunden und Kaninchen nachweisen.

### 3.1.1. Verbrennungs- bzw. Verbrühungsschock

Bei schweren Verbrennungen und Verbrühungen führen massive Plasmaverluste zur absoluten Hypovolämie. Zusätzlich erfolgt eine ausgedehnte Gewebsschädigung.

Beim standardisierten Verbrühungsschock der Ratte konnte ein signifikanter Kininogenabfall nachgewiesen werden (234), der sich nach einigen Stunden wieder normalisierte und von einer überschießenden Kininogenproduktion gefolgt war.

### 3.1.2. Traumatischer Schock

Auch beim traumatischen Schock handelt es sich um einen hypovolämischen Schock durch Blutverlust nach außen und innen kombiniert mit einer Zerstörung von Gewebe.

STARR und WEST (232) fanden bei der Ratte einen erhöhten Kininogenspiegel, URBANITZ et al. (233) dagegen beim Kaninchen einen Kininogenabfall, der einer Verminderung des Gesamteiweißgehaltes entsprach.

WERLE (235) beobachtete bei Schockpatienten nach Verkehrsunfällen Kininogenspiegel von 2 - 14 µg Bradykininäquivalente / ml Plasma (Mittelwert 6,5 µg/ml) bei einem Normalwert von 15 - 20 µg/ml.

### 3.1.3. Schock bei Peritonitis

Bei schwerer Peritonitis kommt es durch Flüssigkeitsverluste in den dritten Raum zur relativen Hypovolämie. NAGEL (236) beschrieb bei Hunden und Ratten mit Perforationsperitonitis einen beträchtlichen Kininogenabfall. Auch bei operierten Patienten mit Peritonitis verhielt sich der Plasmakininogenspiegel ähnlich.

## 3.2. Cardiogener Schock

Hauptursache des cardiogenen Schocks ist der Herzinfarkt. Die Blutdrucksenkung beim Herzinfarkt resultiert aus der verminderten cardialen Förderleistung, aber auch eine Beteiligung der aus dem nekrotischen Myokardgewebe stammenden Proteasen wird diskutiert (237). SICUTERI et al. (1o2, 237), WIEGERSHAUSEN et al. (238) und GOMAZKOV (239) konnten beim Menschen einen Kininogenabfall in den ersten Tagen nach einem Herzinfarkt nachweisen. GOMAZKOV bestimmte noch weitere Komponenten des Kininsystems und fand gleichzeitig mit der Abnahme des Kininogens eine Abnahme des Präkallikreins und des Kallikreininhibitorgehaltes und eine Zunahme der Gesamtesterasenaktivität.
Im Tierexperiment konnte GOMAZKOV bei Ratten zeigen, daß 3o Minuten nach der Unterbindung der linken Kranzarterie der Gehalt an glasaktivierbarem Kininogen im venösen Blut um durchschnittlich 42 % abnahm, während sich die Menge des durch Trypsin aktivierbaren Kininogens praktisch nicht änderte (239). Bei Hunden wurde von MASSION (24o) wenige Minuten nach Unterbindung einer Koronararterie ebenfalls ein signifikanter Kininogenabfall nachgewiesen.

### 3.3. Septischer Schock

Der septische Schock wurde tierexperimentell hauptsächlich durch intravenöse Injektion von Endotoxin zu erzeugen versucht. Durch Endotoxin werden über einen noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus Mediatorsubstanzen freigesetzt, die eine Volumensequestration mit Verminderung des venösen Rückstroms bewirken.

Beim Endotoxinschock des Hundes (241,96,242,231,243,244,245, 246) und des Affen (247,248) wurde ein Abfall des Plasmakininogenspiegels beobachtet. Beim Kaninchen fanden ERDÖS und MIWA (42) keine signifikante Veränderung von durch Pankreaskallikrein aktiviertem Kininogen; das durch Glas aktivierte Kininogen (ca. 30 % des Gesamtkininogens) nahm jedoch fast vollständig ab.

Wie auch bei anderen Schockformen wurde von URBANITZ et al. (233) beim Endotoxinschock von Hund, Kaninchen und Katze ein simultaner geringer Abfall von Plasmaprotein und Kininogen beschrieben. In einer klinischen Studie an Patienten mit posttraumatischer gramnegativer Sepsis konnte von HIRSCH et al. (43) ein initialer Abfall von Kininogen bei allen Patienten nachgewiesen werden. Bei den überlebenden Patienten erreichten die Kininogenspiegel wieder normale Werte, dagegen fielen sie bei den Patienten, die starben, kurz vor dem Tode auf kaum meßbare Werte ab. Gemessen wurde das von endogenem Plasmakallikrein angreifbare Kininogen. Die Aktivierung erfolgte durch speziell präparierten Hageman-Faktor. Gleichzeitig durchgeführte Kininogenbestimmungen mit der Trypsin-Methode, wobei das Gesamtkininogen erfaßt wird, ließen die Veränderungen des Plasmakallikreinsubstrates nur undeutlich erkennen.

### 3.4. Anaphylaktischer und anaphylaktoider Schock

Auch beim anaphylaktischen Schock spielen vasoaktive Mediatorsubstanzen, die im Verlauf der Antigen-Antikörperreaktion gebildet werden, eine entscheidende Rolle.

Beim tierexperimentellen anaphylaktischen bzw. anaphylaktoiden Schock (erzeugt durch i.v. oder ip. Injektion von Fremdeiweiß bzw. Substanzen wie Dextran oder Polyvinylpyrrolidon) wurde von den meisten Experimentatoren bei Hunden, Ratten, Kaninchen und Meerschweinchen ein Kininogenabfall gefunden (19,208,241,249,250,251,252,253).

Im Gegensatz dazu stehen Befunde von BACK et al. (254), STARR und WEST (255), DAWSON et al. (256) und ANKIER und STARR (257), die beim Hund (254) und bei der Ratte sogar einen erhöhten Kininogenspiegel fanden.

## 4. Verschiedene Erkrankungen mit Beteiligung des Kallikrein-Kinin-Systems.

Bei der Pathogenese weiterer Erkrankungen wird eine Mitwirkung des Kallikrein-Kinin-Systems diskutiert. Dem hereditären angioneurotischen Ödem liegt ein C'1-Esterase-Inhibitor-Mangel zugrunde (Literaturübersicht bei 200). Bei einer Präkallikreinaktivierung kommt es durch den Ausfall des Kallikrein-Inhibitors zu einer ungesteuerten Kininbildung. Von BURDON et al. (258) wurde ein erniedrigter Plasmakininogenspiegel kurz nach dem Auftreten der Ödeme beschrieben. Die Ursache des schubweisen Auftretens der Ödeme ist noch unbekannt.

Beim Carcinoid, der tumorösen Entartung der enterochromaffinen Zellen, treten anfallsartig die Symptome Flush, erhöhte intestinale Peristaltik, Bronchospasmen und Hypotension auf. Neben Histamin scheinen auch die Kinine für diese Symptomatik

verantwortlich zu sein (Literaturübersicht bei 259). Nach OATES und MELMON (260) wird durch Stimuli wie Adrenalin aus den Tumoren Kallikrein freigesetzt, das im Blut Kallidin bildet. Diese Autoren fanden während eines spontanen oder durch Adrenalin provozierten Flush im Lebervenenblut hohe Spiegel von Kallikrein und Kinin. GARDNER et al. (261) konnten nach Adrenalin-Stimulation keine freien Kinine im venösen Blut von Carcinoidpatienten nachweisen, der Kininogenspiegel war jedoch erniedrigt. Auch andere Autoren fanden beim Carcinoid erniedrigte Plasmakininogenwerte (262,263,264).

Das Dumping-Syndrom tritt gelegentlich bei Patienten nach Magenoperationen auf. Neben gastrointestinalen Symptomen werden vasomotorische Phänomene wie Blutdruckabfall, Tachykardie, Kopfschmerzen und Flush beobachtet. ZEITLIN und SMITH (263) fanden während typischer Attacken hohe Plasmakininspiegel und gleichzeitig einen Abfall von Kininogen. Auch WONG et al. (265) berichteten über erhöhte Kininspiegel bei 5 Patienten mit Dumping-Syndrom. Lediglich 2 Patienten zeigten eine Aktivierung von Plasmakallikrein, kenntlich an einer Abnahme von Präkallikrein und Kallikrein-Inhibitor. Der Mechanismus der Kininbildung bei den Patienten ohne Plasmakallikreinaktivierung ist unklar. Möglicherweise spielt das Gewerbskallikrein der Darmwand, das bei Kontakt mit hypertonen Lösungen aktiviert wird,eine Rolle. Nach den Untersuchungen von MAC DONALD et al. (266) an Hunden ist zu vermuten, daß Bradykinin die vasomotorische Symptomatik verursacht, während die später auftretenden gastrointestinalen Symptome durch Serotonin ausgelöst werden.

Bei subarachnoidalen und cerebralen Blutungen und bei der Migräne wird ebenfalls eine Beteiligung der Kinine diskutiert (102,267,268,269). Nach PERITI et al. (270) kann durch Histamin der Plasmakininogenspiegel gesenkt werden.

Der gleichzeitig auftretende Abfall von Präkallikrein und Kallikrein-Inhibitor (271) spricht für eine Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems. Ein Zusammenspiel von Histamin und Kallikrein-Kinin-System scheint bei der Migräne von Bedeutung zu sein.

## 5. Hereditärer Kininogenmangel

SAITO et al. beschrieben 1975 einen bisher unbekannten Gerinnungsdefekt, der nach dem Patienten Fitzgerald als FITZGERALD-Faktor-Mangel benannt wurde (272). Das Plasma dieses Patienten zeigte eine verlängerte partielle Thromboplastin-Zeit (PTT), eine gestörte kontaktaktivierte Fibrinolyse, keine Kininbildung durch aktivierten Hageman-Faktor und eine auf die Hälfte der Norm reduzierte Kininbildung bei Inkubation mit Trypsin. Sämtliche bekannten Gerinnungsfaktoren waren in normaler Konzentration vorhanden, mit Ausnahme von Präkallikrein, dessen Konzentration 10 - 15 % der Norm betrug. Durch FLETCHER-Faktor-Mangel-Plasma (Mangel an Präkallikrein) konnte die gestörte Gerinnung und Fibrinolyse korrigiert werden, somit konnte ein Präkallikreinmangel nicht die Ursache dieses Defektes sein. Der FITZGERALD-Faktor wurde als HMW-Kininogen identifiziert (273).

Inzwischen wurden mehrere Patienten mit Kininogen-Mangel beschrieben, so von WUEPPER der FLAUJEAC-Defekt (274) und von COLMAN der WILLIMAS-Defekt (275).

Kininogen-Mangel ist autosomal-rezessiv vererbbar und teilweise mit anderen Faktor-Mängeln vergesellschaftet; so besitzt FITZGERALD-Plasma 10 - 15 % Präkallikrein und WILLIAMS-Plasma 45 % Präkallikrein und 20 % Plasminogen-Proaktivator. Der niedrige Plasminogen-Proaktivator-Spiegel

beim WILLIAMS-Defekt scheint für einen normalen Ablauf der kontaktaktivierten Fibrinolyse ausreichend zu sein, da alleiniger HMW-Kininogen-Zusatz die gestörte Fibrinolyse vollständig korrigiert.

Der Kininogen-Mangel ist unterschiedlich stark ausgeprägt. WILLIAMS-Plasma besitzt kein immunologisch nachweisbares Kininogen, FLAUJEAC-Plasma ca. 9 % des Normalwertes und FITZGERALD-Plasma ca. 50 % durch Trypsin aktivierbares Kininogen. Offensichtlich können nur durch HMW-Kininogen die gestörten Funktionen korrigiert werden.

## V. DAS LEUKOKININ-SYSTEM

Leukozyten und Carcinomzellen enthalten saure Proteasen, die aus dem Protein Leukokininogen hochaktive Peptide, die sogenannten Leukokinine, freisetzen (276). Das Substrat Leukokininogen ist normalerweise im Plasma nicht vorhanden, sondern wird unter pathologischen Bedingungen aus der Vorstufe Proleukokininogen durch einen noch unbekannten Mechanismus gebildet. Leukokinine enthalten 20 - 25 Aminosäuren, darunter jedoch nicht die Bradykininsequenz. Sie wirken extrem permeabilitätssteigernd und blutdrucksenkend.

Bei Mäusen und auch beim Menschen wurden die Komponenten des Leukokinin-Systems vor allem im Ascites bei Neoplasmen nachgewiesen. Pepstatin, ein Protease-Inhibitor, der die Leukokinin-bildenden Enzyme in vitro hemmt, vermindert bei Mäusen signifikant die tumoröse Ascitesbildung (277).

## VI. ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION

Kininogen findet sich hauptsächlich im Blutplasma des Menschen und aller untersuchten Säugetiere. Auch in verschiedenen Geweben und Körperflüssigkeiten konnte Kininogen, jedoch in wesentlich geringerer Konzentration als im Plasma, nachgewiesen werden. Als Bildungsort ist die Leber anzunehmen. Durch proteolytische Enzyme, die Kininogenasen, werden aus Kininogen die pharmakologisch hochaktiven Kinine (Bradykinin, Kallidin, Met-Lys-Bradykinin) freigesetzt. Kininogenasen sind Trypsin, Schlangengiftproteasen, Plasmin und die Kallikreine. Die Angreifbarkeit von Kininogen durch die verschiedenen Kininogenasen variiert mit unterschiedlicher physikalischer und chemischer Vorbehandlung. Bei Verwendung von erhitztem Plasma als Substrat nimmt die Kininausbeute mit verschiedenen Kininogenasen in der Reihenfolge Trypsin > Schlangengift ≫ Pankreaskallikrein ab. Mit Nativplasma dagegen lautet die Reihenfolge Schlangengift > Pankreaskallikrein > Trypsin (31). Für die spezifische Kininogenase Pankreaskallikrein ist ein möglichst natives Molekül die Voraussetzung für einen optimalen Umsatz. Nach Reduktion und Alkylierung von Rinderkininogen können mit Trypsin und Schlangengift Kinine freigesetzt werden, jedoch nicht mehr mit Pankreaskallikrein (67).

Kininogen liegt in zwei Formen vor, die nach der unterschiedlichen Molekülgröße LMW (Low Molecular Weight) und HMW (High Molecular Weight) Kininogen genannt wurden. Bereits vor den ersten Isolierungen war die Existenz verschiedener Kininogene mit funktionell unterschiedlicher Bedeutung postuliert worden (278,279,25,280,281,282,283, 284). Durch die präparative Gewinnung von weitgehend

reinem Kininogen konnte gezeigt werden, daß tatsächlich zwei verschiedene Kininogenformen existieren. Sie unterscheiden sich in physikalisch-chemischen Eigenschaften und in der Substratspezifität gegenüber Plasmakallikrein. LMW-Kininogen reagiert nur sehr langsam mit Plasmakallikrein, HMW-Kininogen dagegen sehr schnell.

Am besten charakterisiert ist das Rinderkininogen. Die LMW-Form besitzt ein Molekulargewicht von 48.000, der isoelektrische Punkt liegt bei pH 3,3. Das Molekulargewicht von HMW-Kininogen beträgt 76.000, der isoelektrische Punkt 4,5. Beide Kininogenformen sind Glycoproteine mit einem Kohlehydratgehalt von 19,8 % (LMW) bzw. 12,6 % (HMW). HMW-Kininogen enthält Galaktosamin, das in LMW-Kininogen nicht vorkommt. Die Aminosäurezusammensetzung beider Kininogene ist sehr ähnlich, mit Ausnahme der Aminosäuren Histidin und Lysin, die in HMW-Kininogen in wesentlich größerer Menge vorkommen. Beide Formen weisen als C-terminale Aminosäure Leucin auf, die N-terminale Aminosäure ist bei LMW-Kininogen Serin, bei HMW-Kininogen ist sie maskiert. Die Primärstruktur von HMW-Kininogen ist weitgehend aufgeklärt: das Molekül besteht aus einer H-Kette (MG = 48500) und einer L-Kette (MG = 16000), die durch eine S-S-Brücke vernetzt sind. Zwischen diesen beiden Molekülanteilen sind die Kininsequenz und zwei weitere Peptide, Fragment 1 und Fragment 2, lokalisiert. Die Aminosäuresequenz dieser Peptide, die außer Bradykinin ebenfalls durch Plasmakallikrein freigesetzt werden, ist vollständig aufgeklärt.

Zahlreiche Arbeitsgruppen befaßten sich mit der Isolierung von Humankininogen. Von einigen Autoren konnte nur ein Kininogen isoliert werden (47,52,50,45), von anderen dagegen analog zum Kininogen des Rindes zwei Kininogenformen, LMW- und HMW-Kininogen (48,54,55,57,62). PIERCE und GUIMARAES (58,59) isolierten sogar vier verschiedene Kininogenformen. Drei dieser Formen bilden jedoch gegenüber der vierten

funktionell (d.h.im Hinblick auf den Umsatz mit Plasmakallikrein) eine Einheit. Jede dieser Formen läßt sich wiederum in zwei bzw. drei Untergruppen mit verschiedenen Molekulargewichten aufteilen.

Ohne Zweifel existieren im menschlichen Plasma, ebenso wie im Rinderplasma, zwei Kininogene, die sich in der Affinität zu Plasmakallikrein sowie im Molekulargewicht unterscheiden. Die Isolierung der HMW-Form gestaltet sich durch die Empfänglichkeit für Plasmakallikrein schwieriger, da durch verschiedene Mechanismen während des Isolierungsvorganges (Kälte, Erhitzen, Verdünnung, Ansäuerung, Ammoniumsulfatfällung) Präkallikrein aktiviert werden kann und somit HMW-Kininogen verbraucht wird und nicht als Isolierungsprodukt erscheint. Dies mag die Erklärung dafür sein, daß verschiedene Autoren zumindest zunächst nur die LMW-Form isolieren konnten.

Indessen besteht keine Klarheit über Molekulargewicht und biochemische Eigenschaften der beiden Kininogenformen im menschlichen Plasma. Für LMW-Kininogen wurden Molekulargewichte von 50.000 - 100.000 beschrieben, für HMW-Kininogen schwanken die Angaben zwischen 110.000 und 225.000. Eine Ursache dieser Diskrepanzen dürfte in den unterschiedlichen Bestimmungsmethoden liegen. Die durch Gel-Filtration ermittelten Werte sind wegen des atypischen Verhaltens von Glykoproteinen bei der Gel-Filtration nicht exakt (285). Jedoch auch die mittels Ultrazentrifugation erhaltenen Werte differieren, z.B. fanden PIERCE und WEBSTER (18) durch Gleichgewichtszentrifugation ein Molekulargewicht von 50.000, SPRAGG und AUSTEN (50) und JACOBSEN (48), die die Methode nach SIEGEL und MONTY (49) anwendeten, beschrieben Molekulargewichte von 70.000 bzw. 57.000.

Eine andere Ursache der offensichtlichen Heterogenität von Kininogen ist die Labilität dieses Moleküls, eine Eigenschaft, die es mit anderen Glykoproteinen gemeinsam hat (286,287).

Kininogen neigt zu Aggregation unter bestimmten Bedingungen. HABERMANN beschrieb für Rinder- und Humankininogen das Auftreten von dimeren Formen bzw. noch höheren Aggregaten bei niedrigem pH und bei Verwendung von hämolytischen Seren (13,288). SEIDEL (57) beobachtete die Bildung von höhermolekularen Formen bei einer Änderung des Elutionsmediums während der Gel-Filtration (Verwendung von Tris-Puffer statt Phosphat-Puffer, geringere Konzentration des Phosphat-Puffers). SPRAGG und AUSTEN (50) fanden nach Lagerung und Gefriertrocknung von Kininogen eine veränderte elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit, die auf eine Aggregationsbildung schließen läßt. Es besteht also die Möglichkeit, daß ein Teil der beschriebenen höhermolekularen Formen kein eigenständiges Molekül darstellt, sondern ein Dimer oder Polymer von LMW- bzw. HMW-Kininogen. HABAL et al. (56) fanden z. B. für das von ihnen isolierte HMW-Kininogen bei Gel-Filtration mit Sephadex G-200 ein Molekulargewicht von ca. 210.000, bei Verwendung von Guanidin-Sepharose jedoch nur noch einen Wert von ca. 108.000. Offensichtlich handelt es sich um dimeres Kininogen, das in 5 M Guanidin-HCl dissoziiert. Ebenso ist die B 3 -ß-Fraktion von PIERCE und GUIMARAES mit einem Molekulargewicht von ca. 150.000 wahrscheinlich ein Dimeres von LMW-Kininogen, da der Williams-Defekt mit dieser Fraktion nicht korrigiert werden kann (275).

Auf der anderen Seite scheint das Kininogenmolekül anfällig zu sein für eine begrenzte Proteolyse. Sie wird diskutiert als Erklärung für die von PIERCE und WEBSTER (18) und HAMBERG (45) beschriebene Heterogenität von

LMW-Kininogen, nämlich die Existenz eines Kininogens mit endständiger und damit für Carboxypeptidase B angreifbarer Kininsequenz (Kininogen I) und eines Kininogens mit geschützter Lokalisation der Kininsequenz (Kininogen II). Diese beiden Formen entsprechen Kininogen-a bzw. Kininogen-b von HMW-Rinder-Kininogen (87). Auch die japanischen Autoren halten Kininogen-a für das Produkt einer limitierten Proteolyse von Kininogen-b. Die Existenz eines der Carboxypeptidase B ähnlichen Enzyms, des Anaphylatoxin Inaktivators im menschlichen Plasma macht das gleichzeitige Vorkommen eines Plasmaproteins mit Lysin oder Arginin am Carboxylende unwahrscheinlich (289). Fraglich ist allerdings, ob diese Proteolyse bereits in vivo stattfindet oder während des Isolierungsvorganges auftritt.

Möglicherweise sind die unterschiedlichen Molekulargewichte, die für LMW-Kininogen beschrieben werden (zwischen 50.000 und 70.000 bei Bestimmung mittels Ultrazentrifugation) bedingt durch unterschiedliche Grade einer begrenzten Proteolyse eines einzigen Moleküls.

Unterschiede im Kohlehydratanteil, wie sie für andere Glykoproteine beschrieben wurden (286,290), mögen ebenfalls zur Heterogenität des Kininogenmoleküls beitragen. So isolierten SPRAGG und AUSTEN (51) zwei Kininogene mit verschiedener elektrophoretischer Wanderungsgeschwindigkeit, Prätransferrin-Kininogen ($\alpha$-Region) und Posttransferrin-Kininogen (ß-Region). Die Sedimentationskonstante und damit die Molekulargewichte dieser beiden Formen differierten nur wenig, Posttransferrin-Kininogen jedoch besaß ein kleineres partielles spezifisches Volumen als Prätransferrin-Kininogen, ein Hinweis auf einen geringeren Kohlehydratgehalt (291).

Die chemische Zusammensetzung und weitere physikalisch-chemische Eigenschaften außer dem Molekulargewicht sind von den zahlreich isolierten menschlichen Kininogenen kaum beschrieben worden. Die Aminosäurezusammensetzung wurde von PIERCE und WEBSTER (18) und von HAMBERG et al. (45) für LMW-Kininogen mit dem Molekulargewicht 50.000 mitgeteilt. Sie gleicht im wesentlichen der Aminosäurekomposition von LMW-Rinderkininogen. Auch der Gehalt an Neuraminsäure (61) stimmt mit dem für LMW-Rinderkininogen beschriebenen Wert überein. Der isoelektrische Punkt jedoch liegt wesentlich höher als bei Rinder-Kininogen.

Über die Struktur von Humankininogen ist wenig bekannt. Nach den Untersuchungen von NAGASAWA und NAKAYASU (62) ist zu vermuten, daß die Polypeptidkette wie im Rinder-Kininogen durch Disulfidbrücken verbunden ist. Die Aminosäurereste in der Nähe der Kininsequenz scheinen sich von der Anordnung im Rinderkininogen zu unterscheiden, es findet sich z. B. kein Methionin-Rest unter den auf das Carboxylende der Kininsequenz folgenden Aminosäuren.

Für Pferdeplasma (92), Kaninchen-, Meerschweinchen-, Ratten- und Hundeplasma (17,95) gibt es Hinweise auf die Existenz von ebenfalls zwei Kininogenformen mit unterschiedlichem Molekulargewicht und unterschiedlicher Substratfunktion.

Eine der physiologischen Bedeutungen von Kininogen liegt in seiner Funktion als Substrat der proteolytischen Enzyme Plasmakallikrein und Gewebskallikreine. Bei dieser Reaktion werden die pharmakologisch hochwirksamen Kinine gebildet, die wiederum rasch durch Kininasen (z. B. Kininase I = Carboxypeptidase N und Kininase II = Angiotensin-converting-enzyme) abgebaut werden.

Plasmakallikrein liegt im Blut als inaktives Präkallikrein vor. Die Aktivierung erfolgt über eine Änderung des Milieus wie z. B. Verdünnung, pH-Änderungen und Temperaturänderungen, sowie über den Hageman-Faktor bei Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen. Durch Plasmin wird der Hageman-Faktor in Fragmente gespalten, die äußerst potente Präkallikrein-Aktivatoren sind. Das aktive Plasmakallikrein greift bevorzugt die höher molekulare Form des im Plasma vorhandenen Kininogens, das HMW-Kininogen, an.

Nach der Aktivierung von Präkallikrein wird das aktive Kallikrein sehr rasch an Inhibitoren gebunden. Die wichtigsten Kallikrein-Inhibitoren sind der C-1-Esterase-Inhibitor und das $\alpha_2$-Makroglobulin. Ähnlich wie das Gerinnungssystem, zu dem enge Beziehungen bestehen (s.u.), ist das Kallikrein-Kinin-System in Form einer Enzymkaskade aufgebaut und befindet sich in einem Zustand der "latenten Aktivierung" (292).

Die physiologische Funktion des Kallikrein-Kinin-Systems des Plasmas ist nicht eindeutig geklärt. Die miteinander eng verbundenen Enzymsysteme Gerinnung, Fibrinolyse, Komplementsystem und Kallikrein-Kinin-System sind insbesondere bei pathologischen Prozessen von Bedeutung.

Diskutiert wird eine Beteiligung des Kallikrein-Kinin-Systems bei der Durchblutungsregulation von Haut und Muskulatur (Kap. III, 2.2.). Eine pH-Verschiebung durch die Anhäufung von sauren Metaboliten, z. B. nach längerer Muskeltätigkeit oder bei Sauerstoffmangel, könnte zu einer Aktivierung des Systems führen. Die Befunde der Gruppe um SCHARNAGEL und GREEFF sprechen für diese Möglichkeit. Andere Arbeitsgruppen kamen jedoch zu negativen Ergebnissen (293,294,295,296,297).

Verschiedene physiologische Vorgänge während der Schwangerschaft und Geburt wurden ebenfalls mit dem Kallikrein-Kinin-System in Zusammenhang gebracht. So wird von einigen Autoren die Beteiligung von Kininen an der Auslösung der Uteruskontraktionen während der Geburt diskutiert. Der Kininogenabfall in dieser Phase wäre dann auf einen erhöhten Verbrauch zurückzuführen (151,298,299,300). Nach PERITI und GASPARRI (98) spricht das Verhalten des Kininogenspiegels während der Geburt für eine Kininbeteiligung an der funktionellen Hyperämie des Uterus während der Wehen.

MELMON (301) postulierte einen Einfluß der Kinine auf die neonatale Kreislaufumstellung des Neugeborenen. Die plötzliche Abkühlung der Nabelschnur des Neugeborenen soll das Kallikrein-Kinin-System aktivieren. Die Kinine führen zu einer Kontraktion der Arterien und Venen der Nabelschnur, während sie zur selben Zeit die Pulmonalgefäße erweitern. Möglicherweise werden diese Vorgänge durch ein Zusammenwirken von Kininen und Protaglandinen gesteuert (131).

Zu den Gewebskallikreinen werden die Kallikreine der Speicheldrüsen, des Pankreas, des Dünn- und Dickdarms und das Kallikrein der Niere gezählt. Sie sollen über eine Kininbildung aus dem Kininogen des Interstitiums wirken.

Als Funktion des Speicheldrüsenkallikreins wird eine Mitwirkung beim Zustandekommen der funktionellen Hyperämie dieser Drüsen angenommen. Diese Theorie ist jedoch umstritten (Kap. III, 2.4.). Nach GAUTVIK (302) existieren zwei Mechanismen zur Regelung der funktionellen Hyperämie nebeneinander: eine nervale kininunabhängige Vasodilatation und eine von Kallikrein und der Bildung von Kininen abhängige.

Da Kallikrein in den Mund- und Bauchspeichel sezerniert wird, erhebt sich die Frage nach seiner Funktion im Verdauungstrakt. Es wurde z. B. die Vorstellung entwickelt, daß im kindlichen Organismus durch Kallikrein aus Colostrokininogen Colostrokinin freigesetzt wird, das die Resorption von Immunkörpern beschleunigen könnte (199). Auch neuere Befunde sprechen dafür, daß dem Kallikrein im Verdauungstrakt über eine Kininbildung in der Mucosa eine resorptionsfördernde Funktion zukommt (143,144,145,303).

Die physiologische Bedeutung des Kallikrein-Kinin-Systems der Niere ist bislang ebenfalls nicht eindeutig geklärt. Die gesunde Niere verbraucht ständig Kininogen als Substrat. Eine erhöhte Kininogenkonzentration im Blut sowie Salyrgangaben steigern die Ausscheidung von Kininen. Nach Salyrgan scheint ein Teil der Kinine außerhalb der Niere im Harntrakt zu entstehen. Wahrscheinlich erhöht Salyrgan die Durchlässigkeit der Glomeruli für Plasmaeiweiß und damit auch für Kininogen, das mit dem physiologischerweise in den Harn abgegebenem Kallikrein zu einer verstärkten Kininfreisetzung führt (176).

Möglicherweise bestehen Beziehungen zur Regelung des Blutdruckes. Hinweise dafür ergeben sich hauptsächlich aus der Pathophysiologie, z. B. ist die Harnkallikreinausscheidung bei den verschiedenen Hochdruckformen einschließlich Phäochromocytom und primärer Aldosteronismus verändert (304). Bei Ratten mit nephrogenem Hochdruck fanden CROXATTO et al. (305) einen signifikant erhöhten Plasmakininogenspiegel. Da die Harnkallikreinausscheidung bei renaler Hypertonie unterhalb der Norm liegt (306,307,308, 309,310), resultiert der erhöhte Kininogenspiegel wahrscheinlich aus einem geringeren Substratverbrauch infolge der verminderten Enzymproduktion in der Niere.

Eine wechselseitige funktionelle Beeinflussung mit dem Renin-Angiotensin-System scheint möglich (311,312,313), ebenso existiert eine Verbindung zu den Catecholaminen: zwischen der Kallikrein-Ausscheidung und der Ausscheidung von Catecholaminen im Urin besteht, auch beim Gesunden, eine direkte Korrelation (176). FELDBERG und LEWIS (123) und RYAN (314) konnten zeigen, daß Bradykinin und Angiotensin II die Freisetzung von Catecholaminen aus dem Nebennierenmark stimulieren, andererseits bewirkt Adrenalin über eine von Mastzellen abhängige Aktivierung des Plasma-Kallikrein-Kinin-Systems eine Kininfreisetzung (315,316). Auch bei der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes wird eine Mitwirkung des Kallikrein-Kinin-Systems der Niere diskutiert (312,317,318,319,320,321).

Eine wichtige Funktion kommt dem Kallikrein-Kinin-System offenbar im Bereich der Fortpflanzung zu. Den Gewebskallikreinen nah verwandt ist das Akrosin, eine Kininogenase, die im Akrosom von Säugetierspermatozoen vorkommt (322, 323,324). Durch Akrosin wird wahrscheinlich unter physiologischen Verhältnissen ständig Kinin aus im Seminalplasma vorhandenem Kininogen freigesetzt und dadurch die Spermatozoenmigration im weiblichen Genitaltrakt reguliert (177).

In den letzten Jahren wurde eine weitere physiologische Funktion des Kininogens neben seiner Rolle als Substrat für Kallikreine entdeckt (siehe Kap. III, 2.7.). HMW-Kininogen ist ein notwendiger Faktor für einen optimalen Ablauf der Hageman-Faktor-abhängigen Reaktionswege Gerinnung, Fibrinolyse und Kininbildung. Diese drei Enzymsysteme sind eng miteinander verbunden: über den Hageman-Faktor, der eine zentrale Rolle bei der Aktivie-

rung spielt, HMW-Kininogen als Co-Faktor des Hageman-Faktors und Kallikrein und Plasmin, die beide als Verstärkersubstanzen wirken, indem sie nach ihrer Aktivierung über den Hageman-Faktor ihrerseits wiederum den Hageman-Faktor aktivieren. Darüber hinaus besteht eine Beziehung zum Komplementsystem über den Hageman-Faktor und wahrscheinlich über Plasmin (325,326,327).

Gut untersucht ist das Kallikrein-Kinin-System und insbesondere das Verhalten des Substrats Kininogen bei verschiedenen pathologischen Prozessen. Auf Grund der pharmakologischen Wirkungen der Kinine (Vasodilatation, Erhöhung der Kapillarpermeabilität, Schmerzerzeugung, Bronchokonstriktion) wurde ihnen eine wichtige Rolle bei Gewebsschädigungen verbunden mit entzündlichen Reaktionen, bei immunologischen Prozessen und beim Schocksyndrom zugesprochen.
Der Plasmakininogenspiegel steigt im Tierexperiment nach Gewebsschädigungen unterschiedlichster Art nach einer gewissen Latenzzeit um das Doppelte bis Dreifache an und erreicht erst im Verlaufe der Heilung wieder den Ausgangswert (Kap. IV, 1.). Vorstellbar ist, daß dieser erhöhte Kininogenspiegel einen gesteigerten Kininogenumsatz am Ort der Gewebsläsion im Interstitium erlaubt, wobei Kininogenasen und Kininasen aus Leukocyten und Gewebszellen beteiligt sind (s.u.). Die Ursache der Kininogenvermehrung ist wahrscheinlich auf eine erhöhte Synthese in der Leber zurückzuführen (118).

Damit gehört Kininogen zu den "akuten Phasenproteinen", ebenso wie die Kininogenasen, das Fibrinogen und das Komplementsystem (328).

Die Annahme, daß das Kallikrein-Kinin-System bei Entzündung und Gewebsschädigung eine bedeutende Rolle spielt, wird nicht nur durch die Veränderung des Plasmakininogen-

spiegels gestützt. Am Entzündungsmodell der thermischen Schädigung der Rattenpfote konnte von verschiedenen Autoren eine Beteiligung der Kinine wahrscheinlich gemacht werden (100,329,330,331,332,333,334), die jedoch von anderer Seite in Zweifel gezogen wurde (335). Auch die Ergebnisse bei der thermischen Schädigung der Kaninchen- und Hundeextremität wurden unterschiedlich gedeutet (336, 337). Mit den Kallikreininhibitoren Trasylol$^{R}$ (332) und Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (175) und mit Kinin-Antagonisten (338,339,340,341,342) konnte die auf Gewebsschädigungen folgende Entzündung zwar nicht verhindert, aber doch zum Teil erheblich abgeschwächt werden.

Der genaue Mechanismus der Kininbildung ist nicht vollständig bekannt. Möglicherweise spielen neben Kallikreinen auch kininbildende Enzyme aus Granulocyten (343,344,345) und Gewebszellen (346,347,348,349,350) eine Rolle. Granulocyten und das Kallikrein-Kinin-System sind eng miteinander verknüpft, so wirkt Kallikrein chemotaktisch auf menschliche neutrophile Granulocyten (351), Bradykinin steigert in vitro die Phagocytose von Bakterien durch Leukocyten (352) und aus menschlichen neutrophilen Granulocyten wird während der Phagocytose eine Kininogenase freigesetzt (343).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Kinine gemeinsam mit anderen Gewebshormonen wie Histamin, Serotonin und den Prostaglandinen wesentlich zu der Ausbildung der entzündlichen Reaktionen nach Gewebsschädigungen beitragen. Nach neueren Befunden sind Histamin und 5-Hydroxytryptamin die Mediatoren für den Soforttyp der entzündlichen Reaktion, während die Kinine eher beim verzögerten Typ der Entzündungsreaktion beteiligt sind (353). Darüber hinaus scheinen die Kinine und andere biologisch aktive

Substanzen auch einen Einfluß auf die Entwicklung des Granulationsgewebes zu haben (354). Der Anstieg des Plasmakininogenspiegels ist als Antwort auf den gesteigerten Substratumsatz am Ort der entzündlichen Reaktion zu werten.

Bei einigen entzündlichen Erkrankungen (Gicht, akute Hepatitis, Malaria und Pankreatitis) wurde eine Beteiligung des Kallikrein-Kininsystems nachgewiesen (Kap. IV, 1.). Bei der akuten Hepatitis wurde ein Kininogenabfall gefunden (214). Wahrscheinlich ist er die Resultante aus erhöhtem Verbrauch und verminderter Syntheserate der geschädigten Leber. Die Malaria, bei der tierexperimentell ebenfalls erniedrigte Plasmakininogenspiegel beschrieben wurden, stellt insofern einen Sonderfall dar, als daß die Gewebsschädigung nicht lokal begrenzt stattfindet. Vielmehr spielt sich das pathologische Geschehen im gesamten Blutgefäßsystem ab und führt zu einer Aktivierung des Plasmakininsystems. Die akute Pankreatitis muß ebenfalls gesondert betrachtet werden. Primär kommt es bei diesem Krankheitsbild zu einem Übertritt von Bauchspeichel aus dem Gangsystem in das Interstitium, verursacht z. B. durch einen Gangverschluß und übermäßige Sekretion. Der Bauchspeichel wirkt als Entzündungsreiz und verursacht eine lokale Kininbildung, wobei Pankreaskallikrein und Plasmakallikrein als Kininogenasen wirksam sind. Durch die Kinine wird das bestehende Ödem verstärkt, es kommt zu einer Zellschädigung und schließlich zur Ausbildung von Nekrosen. Damit gelangen Kininogenasen und Plasmakallikrein aktivierende Enzyme in die Blutbahn und bewirken eine generalisierte Kininbildung, die zum Schock führt (199). Im Schockstadium wurde von zahlreichen Autoren ein starker Kininogenabfall beschrieben. Die Bedeutung des Kallikrein-Kininsystems bei dieser Erkrankung wird un-

terstrichen durch das Ergebnis einer von 1967 - 1974 laufenden Doppelblindstudie, die zeigte, daß Trasylol$^{R}$ bei der Behandlung der akuten Pankreatitis wirksam ist (355).

Nach chirurgischen Eingriffen wurde von AARON (218) ein Abfall des Kininogens gefunden, dem erst nach einigen Tagen ein Anstieg über den Normalwert folgte. Es fehlen jedoch Angaben über Plasmaproteinspiegel und Hämatokrit, so daß die Möglichkeit besteht, daß der Kininogenabfall die Folge einer Hämodilution, z.B. durch eine während des chirurgischen Eingriffs durchgeführte Infusionstherapie war.

Da Antigen-Antikörper-Reaktionen zu einer Aktivierung des Kallikrein-Kininsystems führen, wurde bei einigen immunologischen Erkrankungen (idiopathisches nephrotisches Syndrom, Colitis ulcerosa, Bronchialasthma, rheumatoide Arthritis) eine Beteiligung des Kallikrein-Kinin-Systems postuliert (Kap. IV, 2.). Bei unbehandelten Patienten mit rheumatoider Arthritis wurde ein beträchtlich erhöhter Kininogenspiegel beobachtet (222).

Bei der Ausbildung des pathologischen Kreislaufgeschehens bei verschiedenen Schockformen wurde den Kininen auf Grund ihrer pharmakologischen Wirkungen eine bedeutende Rolle zugesprochen. Ein Anstieg freien Kinins im Blut im Schock konnte in mehreren Untersuchungen nachgewiesen werden (356, 357,358,359,228,247). Durch Trasylol$^{R}$ wurde im Tierversuch (246,360,361,362,363,364,243,254) und beim Patienten (365, 244,246) eine günstige Beeinflussung des Kreislaufverhaltens und der Mortalitätsrate bei verschiedenen Schockformen erzielt. Zahlreiche Arbeiten befaßten sich mit dem Verhalten des Plasmakininogenspiegels im Schock. Mit wenigen Ausnahmen wurde ein mehr oder weniger ausgeprägter Abfall des Kininogengehaltes gefunden und als Ausdruck der Kininbeteiligung gewertet (Kap. IV, 3.). Trasylol$^{R}$ verhindert

in einem gewissen Umfang dieses Absinken des Plasmakininogenspiegels (366,367).

Verschiedene Mechanismen, die zu einer Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems führen, kommen in Betracht. Bei allen Schockformen, die mit einer Gewebsschädigung einhergehen (traumatischer Schock, Verbrennungsschock, cardiogener Schock), muß mit einer Freisetzung von Kininogenasen und anderen proteolytischen Enzymen, die indirekt zu einer Kininbildung beitragen, aus Granulocyten und Gewebszellen gerechnet werden. Gemeinsam mit dem durch den Hageman-Faktor aktivierten Plasmakallikrein können diese Enzyme, wahrscheinlich je nach Ausdehnung des geschädigten Bezirks, zu einer generalisierten Kininbildung führen.

Endotoxin wirkt wahrscheinlich über eine direkte Aktivierung des Hageman-Faktors bzw. über eine Endothelschädigung, die wiederum den Hageman-Faktor aktiviert, kininbildend (368). MILLER (369) vermutet eine zusätzliche Kininbildung über einen an der Oberfläche von Leukocyten vorhandenen Plasminogen-Aktivator, dessen Produktion oder Freisetzung durch Endotoxin stimuliert wird. Aktives Plasmin bewirkt einen Abbau des aktivierten Hageman-Faktors zu Fragmenten, die die Reaktionsfolge von der Blutgerinnung zur Kininbildung verschieben (370).

Unabhängig von der auslösenden Ursache kommt es bei jeder Schockform zu einer massiven Freisetzung von Catecholaminen, einmal bedingt durch die Stress-Situation nach Eintritt eines schockauslösenden Ereignisses (Trauma, Herzinfarkt), zum anderen im Rahmen der sympathico-adrenergen Reaktion, der Antwort des Organismus auf ein Absinken des Herzzeitvolumens. Nach ROTHSCHILD et al. (315,316) führen Catecholamine über einen von Mastzellen abhängigen Mechanismus zu einer Aktivierung des Plasma-Kallikrein-Kinin-Systems.

Die Bedeutung des Kallikrein-Kinin-Systems beim Schock eindeutig zu definieren, ist außerordentlich schwierig

und bislang nicht gelungen. Die Kinine sind nur ein Faktor unter vielen anderen, die in Kombination miteinander das Syndrom Schock unterhalten. Denkbar ist, daß die Kinine bei einigen Schockformen (Endotoxinschock, anaphylaktischer Schock, ausgedehnte Gewebsschädigungen) gemeinsam mit anderen Mediatoren zu der am Anfang fast jeden Schockgeschehens stehenden hämodynamischen Veränderung, nämlich dem Abfall des Herzzeitvolumens, beitragen. In der Spätphase jeder Art von Schock, nachdem die gestörte Mikrozirkulation eine hypoxische Gewebsschädigung ausgelöst hat, ist wiederum eine Kininbeteiligung an der weiteren Verschlechterung der Mikrozirkulation (transkapillärer Flüssigkeitsverlust, Vasokompression durch die Bildung eines perivaskulären Ödems, Verstärkung der primären Hypovolämie) denkbar.

Bei einer Reihe weiterer Erkrankungen ist das Kallikrein-Kinin-System von Bedeutung (Kap. IV, 4.). Die Ursache des hereditären angioneurotischen Ödems ist ein C-1-Esterase-Inhibitor-Mangel. Durch den Ausfall des Kallikrein-Inhibitors kommt es bei einer Aktivierung von Präkallikrein zu einer ungesteuerten Kininbildung. Beim Carcinoid, der tumorösen Entartung der entero-chromaffinen Zellen, wird durch Stimuli wie Adrenalin aus den Tumoren Kallikrein freigesetzt. Das im Blut gebildete Kallidin scheint neben Histamin für die typische Symptomatik verantwortlich zu sein. Die Symptome beim Dumping-Syndrom werden wahrscheinlich durch Serotonin und Bradykinin verursacht. Möglicherweise wird durch Kontakt mit hypertonen Lösungen das Kallikrein der Darmwand aktiviert. Bei diesen drei Erkrankungen wurden im Anfall erniedrigte Plasmakininogenspiegel nachgewiesen.

In den letzten Jahren wurden mehrere Fälle von erblichem Kininogenmangel beschrieben (Kap. IV, 5.). Neben einer verminderten oder fehlenden Kininbildung zeigte das Plasma dieser Patienten eine gestörte Gerinnung und Fibrinolyse. Durch HMW-Kininogen waren die gestörten Funktionen vollständig korrigierbar. Damit war die bisher unbekannte physiologische Funktion von HMW-Kininogen als Co-Faktor des Hageman-Faktors entdeckt.

Sämtliche Patienten mit Kininogen-Mangel waren klinisch asymptomatisch, jedoch ist denkbar, daß sich der Kininogen-Mangel bei pathologischen Vorgängen wie Entzündung, Gewebsschädigung und Schock, bei denen die drei Systeme Gerinnung, Fibrinolyse und Kininbildung von Bedeutung sind, in einem veränderten Ablauf des pathologischen Geschehens bemerkbar macht.

Besonderes Interesse hat in der letzten Zeit das Leukokinin-System gefunden (Kap. V). Die Leukokinine sind chemisch von den Kininen verschiedene Peptide, die extrem permeabilitätssteigernd und blutdrucksenkend wirken. Sie werden unter pathologischen Bedingungen aus dem Substrat Leukokininogen durch saure Proteasen aus Leukocyten und Carcinomzellen freigesetzt. Die Ascites-Bildung bei Neoplasmen wird vermutlich durch Leukokinine verursacht.

Um die physiologische und pathophysiologische Funktion eines biologisch aktiven Systems aufzuklären, wird versucht, die Komponenten bei Funktionsabläufen, die den pharmakologischen Wirkungen des Systems entsprechen, zu bestimmen. Auch Versuche mit Inhibitoren oder Antagonisten können dazu beitragen, Klarheit über die Bedeutung einer Substanz oder eines Systems zu erhalten. Aus verschiedenen Gründen ist die Interpretation der Ergebnisse jedoch oft nicht einfach. Im Falle des Kallikrein-Kinin-Systems wurde

häufig der Inhibitor Trasylol$^R$ zu Hemmversuchen benützt. Trasylol$^R$ ist jedoch ein polyvalenter Proteasen-Inhibitor mit zahlreichen Angriffspunkten, so daß aus einem positiven Hemmversuch nicht unbedingt auf eine Beteiligung des Kallikrein-Kinin-Systems geschlossen werden kann. Die Kinine sind wegen ihrer außerordentlich kurzen Halbwertszeit schwierig nachzuweisen. Deshalb wurde bevorzugt der Plasmaspiegel des Substrats Kininogen bestimmt, um eine Aktivierung des Systems aufzuzeigen.

Ein Abfall des Kininogenspiegels ist jedoch nicht unbedingt mit einer Kininfreisetzung gleichzusetzen. Enzyme wie z. B. Chymotrypsin spalten aus Kininogen eine Sequenz ab, die Kinin enthält, ohne aber Kinin freizusetzen (113). Eine vermehrte oder verminderte Produktion von Kininogen kann ebenfalls die Höhe des Plasmaspiegels beeinflussen. Schließlich kann das Auftreten einer Hämodilution oder Hämokonzentration zu Änderungen des Plasmakininogenspiegels führen, ohne daß innerhalb des Kallikrein-Kinin-Systems eine Bewegung stattfindet. Als Beispiel sei die Hämodilution in der frühen Schockphase angeführt, die durch die schockspezifische Vasomotion ausgelöst wird. In der späten Schockphase dagegen kommt es zu einer Hämokonzentration. Mehrfach wurde aus diesem Grunde vorgeschlagen, die Kininogenkonzentration nicht pro ml Plasma anzugeben, sondern auf den Plasmaproteingehalt zu beziehen (233,371).

Eine weitere Schwierigkeit entsteht aus der Tatsache, daß im Plasma zwei verschiedene Kininogene vorkommen. Der Anteil von HMW-Kininogen beträgt 20 - 30 % (siehe Kap. II). Eine selektive Freisetzung von Kinin aus HMW-Kininogen durch Plasmakallikrein könnte sich dem Nachweis entziehen, da bei der am häufigsten angewandten Trypsin-Methode, bei der das Gesamtkininogen erfaßt wird, eine relativ große Fehlerbreite besteht. Die Kininogenbestimmung mit glas-

aktiviertem endogenem Plasmakallikrein hat den Nachteil, daß als limitierender Faktor der im Plasma vorhandene Hageman-Faktor auftreten kann, noch bevor das verfügbare HMW-Kininogen vollständig umgesetzt ist. Eine bessere Lösung scheint die Bestimmungsmethode mit durch speziell präparierten Hageman-Faktor aktiviertem endogenem Plasmakallikrein zu sein. Unter der Voraussetzung, daß genügend Präkallikrein im Plasma vorhanden ist, kann angenommen werden, daß das verfügbare HMW-Kininogen vollständig nachgewiesen wird (43).

Die angeführten Punkte machen deutlich, daß aus Veränderungen des Plasmakininogenspiegels alleine nicht unbedingt auf eine Aktivierung des Kininsystems geschlossen werden kann. Die gleichzeitige Bestimmung mehrerer Parameter des Systems erlaubt eher eine Aussage.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS


1) Werle, E., Götze, W., Keppler, A., Biochem. Z. 289, 217 (1937)

2) Werle, E., Angew. Chemie A 60, 53 (1948)

3) Rocha E Silva, M., Beraldo, W.T., Rosenfeld, G., Amer. J. Physiol. 156, 261 (1949)

4) Habermann, E. und G. Rosenbuch, Naun.-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 243, 357 (1962)

5) Webster, M., in: Hypotensive peptides, p. 648, ed. by E.G. Erdös, N. Back and F. Sicuteri. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966

6) Elliot, D.F., Horton, E.W. and G.P. Lewis, Biochem. J. 78, 60 (1961)

7) Webster, M.E., Pierce, J.V., Ann. N. Y. Acad. Sci. 104, 91 (1963)

8) Pierce, J.V. and M.E. Webster, Biochem. Biophys. Res. Commun. 5, 353 (1961)

9) Werle, E., Trautschold, I. und G. Leysath, Z. Physiol. Chem. 326, 174 (1961)

10) Garbe, G. und W. Vogt, Naun.-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 256, 119 (1967)

11) Elliot, D.F., Lewis, G.P. and D.G. Smyth, Biochem. J. 87, 21 (1963)

12) Guimaraes, J.A., Pierce, J.V., Hial, V., Pisano, J.J., in: Adv. Exp. Med. Biol., Vol. 70, p. 265, ed. by F. Sicuteri, N. Back and G.L. Haberland. New York: Plenum Press 1976

13) Habermann, E., Biochem. Z. 337, 440 (1963)

14) Nagasawa, S., Mizushima, Y., Sato, T., Iwanaga, S., Suzuki, T. J. Biochem. (Tokyo) 60, 643 (1966)

15) Suzuki, T., Iwanaga, S., Sato, T., Nagasawa, S., Kato, H., Yano, M., Horinchi, K., in: Bradykinin and related kinins, p. 27, ed. by M. Rocha E Silva and H. Rothschild. Sao Paulo 1967

16) Jacobsen, S., Nature 210, 98 (1966)

17) Jacobsen, S., Brit. J. Pharmacol. 26, 403 (1966)

18) Pierce, J. V. and M. E. Webster, in: Hypotensive peptides, p. 130, ed. by E.G. Erdös, N. Back and F. Sicuteri. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966

19) Diniz, C. R., Carvalho, J. F., Ann. N. Y. Acad. Sci. 104, 77 (1963)

20) Van Arman, C. G., in: Polypeptides which stimulate plain muscle, p. 103, ed. by J. H. Gaddum. London: Livingstone 1955

21) Hamberg, U., Rocha E Silva, M., Arch. int. Pharmacodyn. 110, 222 (1957)

22) Horton, E. W., J. Physiol. (Lond.) 142, 36 (1958)

23) Rinvik, S. F., Dyrud, O. K., Briseid, K., Acta pharmacol. (Kbh) 24, 169 (1966)

24) Trautschold, I., Habil.-Schr. Med. Fakultät, Univ. München 1965

25) Margolis, J. and E. Bishop, Austr. J. exp. Biol. med. Sci. 41, 293 (1963)

26) Garbe, G., Naun.-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 256, 112 (1967)

27) Erdös, E.G., Renfrew, A.G., Sloane, E.M., Wohler, I.R., Ann. N. Y. Acad. Sci. 104, 222 (1963)

28) Habermann, E., Klett, W., Rosenbusch, G., Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 332, 121 (1963)

29) Brocklehurst, W. E., Zeitling I. J., J. Physiol. (Lond.) 191, 417 (1967)

30) Edery, H., Brit. J. Pharmacol. 22, 371 (1964)

31) Habermann, E., in: Handbook of exp. Pharmacol, Vol. XXV, p. 250, ed. by E.G. Erdös. Berlin - Heidelberg - New York: Springer 1970

32) Paskhina, T.S., Egorova, T.P., Biokhimiya 31, 468 (1966)

33) Werle, E. und P. Zach, Z. klin. Chem. klin. Biochem. 8, 186 (1970)

34) Greenbaum, L.M., Hosoda, T., Biochem. Pharmacol. 12, 325 (1963)

35) Hamberg, U., Elg, P., Stelwagen, P., Scand. J. clin. Lab. Invest. 24 Suppl. 107, 21 (1969)

36) Aarsen, P. N., Brit. J. Pharmacol. 32, 453 (1968)

37) Louhija, A. und R. Sipilä, Acta pharmacol. et toxicol. 30, 122 (1971)

38) Habermann, E. und G. Blennemann, Naun.-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 249, 357 (1964)

39) Stürmer, E. and B. Berde, J. Pharmacol. exp. Ther. 139, 38 (1963)

40) Briseid, K., Dyrud, O.K., Rinvik, S.F., Acta pharmacol. (Kbh.) 25, 201 (1967)

41) Briseid, K., Dyrud, O.K., Arntzen, F. C., Acta pharmacol. et toxicol. (Kbh.) 26, 402 (1968)

42) Erdös, E. G., Miwa, I., Fed. Proc. 27, 92 (1968)

43) Hirsch, E., Nakajima, T., Oshima, G., Erdös, E., Herman, C. M., J. Surg. Res. 17, 147 (1974)

44) Spragg, J., Haber, E., Austen, K.F., J. Immunol. 104, 1348 (1970)

45) Hamberg, U., Elg, P., Nissinen, E., Stelwagen, P., Int. J. Pept. Prot. Res. 7, 261 (1975)

46) Pierce, J.V., Fed. Proc. 27, 52 (1968)

47) Brocklehurst, W.E., Mawer, G.E., Brit. J. Pharmac. Chemother. 27, 256 (1966)

48) Jacobsen, S. and M. Kriz, Brit. J. Pharmac. Chemother. 29, 25 (1967)

49) Siegel, L. M., Monty, K. J., Biochem. biophys. Res. Commun. 19, 494 (1965)

50) Spragg, J. and K. F. Austen, J. Immunol. 107, 1512 (1971)

51) Spragg, J. and K. F. Austen, Biochem. Pharmacol. 23, 781 (1974)

52) Cochrane, C. G. and K. D. Wuepper, in: Immunpathology VI, p. 220, ed. by P. Miescher. Basel - Stuttgart: Schwabe 1971

53) Wuepper, K.D., Cochrane, C. G., in: Biochemistry of the Acute Allergic Reactions, p. 299, ed. by K. F. Austen and E. L. Becker. Oxf./Edinb./London/Melbourne: Blackwell Sci. Publ. 1971

54) Habal, F. M. and H. Movat, Res. Comm. Chem. Path. Pharmac. 4, 477 (1972)

55) Habal, F. M., Movat, H. Z., Burrowes, C. E., Biochem. Pharmacol. 23, 2291 (1974)

56) Habal, F. M., Underdown, B. J., Movat, H. Z., Biochem. Pharmacol. 24, 1241 (1975)

57) Seidel, G., Agents and Actions 3/1, 12 (1973)

58) Guimaraes, J.A., Cheulu, R., Webster, M.E. and J.V. Pierce, Fed. Proc. 33, 641 (1974)

59) Pierce, J. V. and J. A. Guimaraes, in: The Kallikrein System in Health and Desease. Fogarty International Center Proceedings 27, ed. by J. J. Pisano and K. F. Austen. Washington: U. S. Government Printing Office 1975

60) Pierce, J. V. and J. A. Guimaraes, Life Sci. 16, 790 (1975)

61) Londesborough, J. C. and U. Hamberg, Biochem. J. 145, 401 (1975)

62) Nagasawa, S. and T. Nakayasu, Life Sci. 16, 791 (1975)

63) Komiya, M., Kato, H., Suzuki, T., J. Biochem. 76, 833 (1974)

64) Suzuku, T., Iwanaga, S., Nagasawa, S., Sato, T., in: Hypotensive peptides, p. 149, ed. by E. G. Erdös, N. Back and F. Sicuteri. Berlin - Heidelberg - New York: Springer 1966

65) Yano, M., Kato, H., Nagasawa, S., Suzuki, T., J. Biochem. (Tokyo) 62, 386 (1967)

66) Kato, H., Suzuki, T., Ikeda, K., Hamaguchi, K., J. Biochem. (Tokyo) 62, 591 (1967)

67) Kato, H., Nagasawa, S., Suzuki, T., Biochem. biophys. Res. Commun. 27, 163 (1967)

68) Greenbaum, L.M. and T. Hosoda, Pharmacologist 5, 263 (1963)

69) Greenbaum, L. M., Yamafuii, K., Hosoda, T., Biochem. Pharmacol. 14, 411 (1965)

70) Habermann, E., Blennemann, G., Naun.-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 247, 324 (1964)

71) Habermann, E. und S. Schuck, Naturwissenschaften 51, 61 (1964)

72) Werle, E. und K. Hochstrasser, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 332, 322 (1963)

73) Habermann, E., Naun.-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 251, 187 (1965)

74) Habermann, E., in: Hypotensive peptides, p. 116, ed. by E. G. Erdös, N. Back and F. Sicuteri. Berlin - Heidelberg - New York: Springer 1966

75) Habermann, E., Naun.-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 253, 474 (1966)

76) Habermann, E., Blennemann, G., Müller, B., Naun.-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 253, 444 (1966)

77) Habermann, E., Müller, B., Naun.-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 253, 464 (1966)

78) Habermann, E., Helbig, J., Naun.-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 255, 20 (1966)

79) Habermann, E. und J. Helbig, Naun.-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 258, 160 (1967)

80) Kato, H., Suzuki, T., Biochem. biophys. Res. Commun. 32, 800 (1968)

81) Hochstrasser, K. und E. Werle, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 348, 177 (1967)

82) Nagasawa, S., Horinchi, K., Yano, M., Suzuki, T., J. Biochem. (Tokyo) 62, 398 (1967)

83) Yano, M., Nagasawa, S., Suzuki, T., J. Biochem. (Tokyo) 69, 471 (1971)

84) Yano, M., Nagasawa, S., Horinchi, K., Suzuki, T., J. Biochem. (Tokyo) 62, 504 (1967)

85) Komiya, M., Kato, H., Yano, M., Suzuki, T., in: Adv. Exp. Med. Biol., Vol. 21, p. 33, ed. by N. Back and F. Sicuteri. New York: Plenum Press 1972

86) Komiya, M., Kato, H., Suzuki, T., J. Biochem. 76, 811 (1974)

87) Komiya, M., Kato, H. and T. Suzuki, J. Biochem. 76, 823 (1974)

88) Han, Y. N., Komiya, M., Iwanaga, S., Suzuki, T.,J.Biochem. 77, 55 (1975)

89) Han, Y. N., Kato, H., Iwanaga, S., Suzuki, T., Febs Letters 63, 197 (1976)

90) Han, Y. N., Komiya, M., Kato, H., Iwanaga, S., Suzuki, T., Febs Letters 57, 254 (1975)

91) Henriques, O. B., Picarelli, Z. P., Ferraz De Oliveira, M. C., Biochem. Pharmacol. 11, 707 (1962)

92) Henriques, O. B., Kauritcheva, N., Kuznetsova, V., Astrakan, M., Nature (Lond.) 215, 1200 (1967)

93) Egorova, T. P., Paskhina, T. S., Biokhimiya 32, 354 (1967)

94) Egorova, T. P., Makarova, O. V., Paskhina, T. S., Biokhimiya 34, 610 (1969)

95) Jacobsen, S., Brit. J. Pharmacol. Chemother. 28, 64 (1966)

96) Diniz, C. R., Carvalho, J. F., Reis, M. L., Corrado, A. P., in: Bradykinin and related kinins, p. 15, ed. by M. Rocha E Silva and H. Rothschild. Sao Paulo 1967

97) Mouri, T., Tohoku J. exp. Med. 98, 147 (1969)

98) Periti, P., Gasparri, F., in: Hypotensive peptides, p. 536, ed. by E. G. Erdös, N. Back and F. Sicuteri. Berlin - Heidelberg - New York: Springer 1966

99) Margolis, J., in: Hypotensive peptides, p. 198, ed. by E. G. Erdös, N. Back and F. Sicuteri. Berlin - Heidelberg - New York: Springer 1966

100) Rocha E Silva, M., Ann. N. Y. Acad. Sci. 104, 190 (1963)

101) Trautschold, I., Fritz, H., Werle, E., in: Hypotensive peptides, p. 221, ed. by E. G. Erdös, N. Back und F. Sicuteri. Berlin - Heidelberg - New York: Springer 1966

102) Sicuteri, F., Franchi, G., Del Bianco, P. L., Fanciullacci, M., in: Hypotensive peptides, p. 522, ed. by E. G. Erdös, N. Back and F. Sicuteri. Berlin - Heidelberg - New York: Springer 1966

103) Scharnagel, K., Greeff, K., Naun.-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 253, 81 (1966)

104) Werle, E., Hochstrasser, K., Trautschold, I., in: Hypotensive peptides, p. 105, ed. by E. G. Erdös, N. Back and F. Sicuteri. Berlin - Heidelberg - New York: Springer 1966

105) Sardesai, V. M., Canad. J. Phys. Pharmac. 46, 77 (1968)

106) Schachter, M., in: Polypeptides which affect smooth muscles and blood vessels, p. 241, ed. by M. Schachter. London: Pergamon press 1960

107) Jacobsen, S., Brit. J. Pharmacol. 27, 213 (1966)

108) Geiger, R., Feifel, G., Haberland, G. L., Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 358, 931 (1977)

109) Werle, E. und I. Trautschold, Z. Biol. 111, 169 (1960)

110) Chapman, L. F. and H. G. Wolff, Science 128, 1208 (1958)

111) Chapman, L. F., Goodell, H., Wolff, H. G., Arch. Neurol. 1, 557 (1959)

112) Sicuteri, F., Del Bianco, P. L., Fanciullacci, M., Anselmi, B., Boll. Soc. Ital. Biol. sper. 41, 462 (1965)

113) Habermann, E., Dtsch. Med. Wschr. 93, 40 (1968)

114) Gautvik, K. M., Rugstad, H. E., Brit. J. Pharmacol. 31, 390 (1967)

115) Rothschild, A. M., in: Bradykinin and related kinins, p. 197, ed. by M. Rocha E Silva and H. Rothschild. Sao Paulo 1967

116) Lukjan, H., Czokali, M., Kiersnowska, B., Bielawiec, M., Acta Hepato-Gastroenterol. 22, 89 (1975)

117) Bryan, F. T., Ryan, J. W., Niemeyer, R. S., in: Adv. Exp. Med. Biol., Vol. 21, p. 43, ed. by N. Back and F. Sicuteri. New York: Plenum Press 1972

118) Borges, D. R., Gordon, A. H., J. Pharm. Pharmac. 28, 44 (1976)

119) Schachter, M., A. Rev. Pharmac. 4, 281 (1964)

120) Erdös, G., Adv. Pharmac. 4, 1 (1966)

121) Melmon, K. L., Cline, M. J., Am. J. Med. 43, 153 (1967)

122) Rocha E Silva, M., Life Sci. 15, 7 (1974)

123) Feldberg, W., Lewis, G. P., J. Physiol. (Lond.) 171, 98 (1964)

124) Douglas, W. W., Kanno, T., Sampson, S. R., J. Physiol. (Lond.) 188, 107 (1967)

125) Joyner, W. L., Carter, R. D., Raizes, G. S., Renkin, E. M., Microvasc. Res. 7, 19 (1974)

126) Carter, R. D., Joyner, W. L., Renkin, E. M., Microvasc. Res. 7, 31 (1974)

127) Renkin, E. M., Carter, R. D., Joyner, W. L., Microvas. Res. 7, 49 (1974)

128) Collier, H. O. J., Ann. N. Y. Acad. Sci. 104, 290 (1963)

129) Vane, J. R., Ferreira, S. H., Life Sci. 16, 804 (1975)

130) Mc Giff, J. C., Life Sci. 16, 805 (1975)

131) Terragno, N. A., Terragno, A., Jennings, D. S. and J. C. Mc Giff, Gyn. Inv. 6, 18 (1975)

132) Ferreira, S. H., Moncada, S. and Vane, I. R., Brit. J. Pharmacol. 50, 461 (1974)

133) Thomas, G., West, G. B., J. Pharm. Pharmacol. 25, 747 (1973)

134) Katori, M., Isoda, K., Tanaka, K., Life Sci. 16, 806 (1975)

135) Williams, T. J., Morley, J., Nature 246, 215 (1973)

136) Rocha E Silva, M., Morato, M., De Almeida, A. P., Antonio, A., in: Adv. Exp. Med. Biol., Vol. 70, p. 117, ed. by F. Sicuteri, N. Back and G. L. Haberland. New York: Plenum Press 1976

137) Beaulnes, A., Ling, E. M., Fed. Proc. 27, 471 (1968)

138) Capek, R., Masek, K., Sramka, M., Krsiak, M., Svec. P., Pharmacol. 2, 161 (1969)

139) Phillis, J. W., Limacher, J. J., Exp. Neurol. 43, 414 (1974)

140) Phillis, J. W., Limacher, J. J., Brain Res. 69, 158 (1974)

141) Rixon, R. H., Whitfield, J. F., Bayliss, J., Horm. Metab. Res. 3, 279 (1972)

142) Rohen, J. W., Peterhoff, I., in: Kininogenases-Kallikrein: 1st Symposium on Physiological Properties and Pharmacological Rational, p. 147, ed. by G. L. Haberland and J. W. Rohen. Stuttgart - New York: Schattauer 1973

143) Moriwaki, C., Moriya, H., Yamaguchi, A., Kizuki, K., Fujimore, H., in: Kininogenases-Kallikrein: 1st Symposium on Physiological Properties and Pharmacological Rational, p. 57, ed. by G. L. Haberland and J. W. Rohen. Stuttgart - New York: Schattauer 1973

144) Meng, K., Haberland, G. L., in: Kininogenases-Kallikrein: 1st Symposium on Physiological Properties and Pharmacological Rational, p. 75, ed. by G. L. Haberland and J. W. Rohen. Stuttgart - New York: Schattauer 1973

145) Dennhardt, R., Haberich, F.J., in: Kininogenases-Kallikrein: 1st Symposium on Physiological Properties and Pharmacological Rational, p. 81, ed. by G. L. Haberland and J. W. Rohen. Stuttgart - New York: Schattauer 1973

146) Bavazzano, A., Sidell, N., Michelacci, S., Sicuteri, F., in: Adv. Exp. Med. Biol., Vol. 8, p. 337, ed. by F. Sicuteri, M. Rocha E Silva and N. Back. New York: Plenum Press 1970

147) Greeff, K., Scharnagel, K., Med. Pharm. exper. 15, 68 (1966)

148) Wiegershausen, B., Paegelow, I., Neumayer, E., Walter, H., Acta biol. med. germ. 19, 61 (1967)

149) Wiegershausen, B., Henninghausen, G., Paegelow, I., Klausch, B., in: Adv. Exp. Med. Biol., Vol. 8, p. 363, ed. by F. Sicuteri, M. Rocha E Silva and N. Back. New York: Plenum Press 1970

150) Porter, I. F., Shennan, A. T., Smith, S., J. Reprod. Fert. 30, 247 (1972)

151) Armstrong, D., Jepson, J. B., Keele, C. A., Stewart, J. W., J. Physiol. (Lond.) 150, 20 (1960)

152) Martinez, A. R., Carvalho, I. F., Diniz, C. R., J. Obstet. Gynaec. Br. Commun. 69, 1011 (1962)

153) Wiegershausen, B., Klausch, B., Henninghausen, G., Sosat, R., Experientia 24, 1128 (1968)

154) Mc Cormick, J. T., Senior, J., Brit. J. Pharmac. Chemother. 43, 421 (1971)

155) Mc Cormick, J. T., Senior, J., Brit. J. Pharmac. 50, 237 (1974)

156) Mc Cormick, J. T., Senior, J., Arch. int. Pharmacodyn. 210, 221 (1974)

157) Mc Cormick, J. T., Senior, J., Whalley, E. T., Brit. J. Pharmac. 52, 533 (1974)

158) Senior, J., Whalley, E. T., J. Reprod. Fert. 38, 165 (1974)

159) Senior, J., Whalley, E. T., J. Reprod. Fert. 41, 425 (1974)

160) Prasad, S. P., Raviprakash, V., Sabir, M. and N. K. Bhattacharyya, J. Reprod. Fert. 42, 229 (1975)

161) Hilton, S. M., Lewis, G. P., J. Physiol. (Lond.) 128, 235 (1955)

162) Hilton, S. M., Lewis, G. P., J. Physiol. (Lond.) 129, 253 (1955)

163) Hilton, S. M., Lewis, G. P., J. Physiol. (Lond.) 134, 471 (1956)

164) Lewis, G. P., Gastroenterology 52, 406 (1967)

165) Gautvik, K. M., Hilton, S. M., Torres, S. H., J. Physiol. (Lond.) 197, 22 (1968)

166) Bhoola, K. D., Morley, J., Schachter, M., Smaje, L. H., J. Physiol. (Lond.) 179, 172 (1965)

167) Beilenson, S., Schachter, M., Smaje, L. H., J. Physiol. (Lond.) 199, 303 (1968)

168) Skinner, N. S., Webster, M. E., J. Physiol. (Lond.) 195, 505 (1968)

169) Morley, J., Schachter, M., Smaje, L. H., J. Physiol. (Lond.) 187, 595 (1966)

170) Schachter, M., Barbon, S., Life Sci. 16, 813 (1975)

171) Abe, K., Yoshinaga, K., Miwa, I., Aida, M., Maebashi, M., Watanabe, N., Tohoku J. exp. Med. 82, 270 (1964)

172) Yoshinaga, K., Abe, K., Miwa, I., Furuyama, T., Suzuki, T., Experientia 20, 396 (1964)

173) Werle, E., Leysath, G., Schmal, A., Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 349, 107 (1968)

174) Croxatto, R. H., Medicina Buenos Aires 32, 18 (1972)

175) Zach, H. P., Werle, E., Res. exp. Med. 161, 89 (1973)

176) Werle, E., Münch. Med. Wschr. 115, 225 (1973)

177) Schill, W. B., Haberland, G. L., Klin. Wschr. 53, 73 (1975)

178) Margolis, J., J. Physiol. 144, 1 (1958)

179) Ratnoff, O. D., Rosenblum, J., Am. J. Med. 25, 160 (1958)

180) Niewiarowski, S., Prou-Wartelle, O., Thromb. Diath. Haemorrh. 3, 593 (1959)

181) Hathaway, W. E., Belhasen, L. P., Hathaway, H. S., Blood 26, 521 (1965)

182) Wuepper, K. D., in: Inflammation, Mechanisms and Control, p. 93, ed. by I. H. Lepow and P. A. Ward. New York: Academic press 1972

183) Weiss, A. S., Gallin, J. I., Kaplan, A. P., J. Clin. Invest. 53, 622 (1974)

184) Saito, H., Ratnoff, O. D., Donaldson, V. H., Circ. Res. 34, 641 (1974)

185) Donaldson, V. H., Saito, H., Ratnoff, O. D., Circ. Res. 34, 652 (1974)

186) Kaplan, A. P., Life Sci. 16, 803 (1975)

187) Cochrane, C. G., Life Sci. 16, 784 (1975)

188) Schiffman, S., Lee, P., Brit. J. Haematol. 27, 101 (1974)

189) Schiffman, S., Lee, P., Waldmann, R., Thromb. Res. 6, 451 (1975)

190) Lin, C. Y., Bagdasarian, A., Meier, H., Scott, C. F., Pierce, J., Kaplan, A.P., Colman, R.W., Fed. Proceed. 35, 692 (1976)

191) Meier, H. L., Webster, M., Lin, C. Y., Colman, R. W., Kaplan, A. P., Fed. Proc. 35, 692 (1976)

192) Revak, S. D., Cochrane, C. G., Griffin, J. H., Fed. Proc. 35, 692 (1976)

193) Griffin, J. H., Cochrane, C. G., Fed. Proc. 35, 692 (1976)

194) Waldmann, R., Scicli, A. G., Mc Gregor, R. K., Carretero, O. A., Abraham, J. P., Kato, H., Han, Y. N., Iwanaga, S., Thromb. Res. 8, 785 (1976)

195) Zach, H. P., Werle, E., in: Adv. Exp. Med. Biol., Vol. 21, p. 371, ed. by N. Back and F. Sicuteri. New York: Plenum Press 1972

196) Reichenbach-Klinke, K.-E., Werle, E., Henneberg, R., Messerschmidt, O., Strahlentherapie 148, 619 (1974)

197) Gaponjuk, P., Umarhodzajew, E. M., Radiobiolgia 10, 681 (1970)

198) Kocmierska-Grodzka, D., Radiobiol. Radiother. 13, 443 (1972)

199) Frey, E. K., Kraut, H., Werle, E., Vogel, R., Zickgraf, G., Trautschold, I., Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren. Stuttgart: Enke Verlag 1968

200) Vogel, R., Zickgraf-Rüdel, G., in: Handbook of Exp. Pharmacology, Vol. XXV, p. 550, ed. by E. G. Erdös. Berlin - Heidelberg - New York: Springer 1970

201) Hollenberg, M., Kobold, E. E., Pruett, R., Thal, A. P., Surg. Forum 13, 302 (1962)

202) Thal, A. P., Kobold, E. E., Hollenberg, M. J., Amer. J. Surg. 105, 708 (1963)

203) Haig, T. H. B., Thompson, A. G., Canad. J. Surg. 7, 97 (1964)

204) Ryan, J. W., Moffat, J. G., Thompson, A. G., Nature (Lond.) 204, 1212 (1964)

205) Ryan, J. W., Moffat, J. G., Thompson, A. G., Arch. Surg. 91, 14 (1965)

206) Katz, W., Silverstein, M., Kobold, E. E., Thal, A. P., Arch. Surg. 89, 322 (1964)

207) Greeff, K., in: Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, S. 135, hrsg. von R. Gross und G. Kroneberg. Stuttgart: Schattauer 1966

208) Diniz, C. R., Carvalho, J. F., Reis, M. L., Corrada, A. P., in: Bradykinin and related kinins, p. 15, ed. by M. Rocha E Silva and H. Rothschild. Sao Paulo 1967

209) Melmon, K. L., Webster, M. E., Goldfinger, S. E., Seegmiller, J. E., Arthritis Rheum. 10, 13 (1967)

210) Kellermeyer, R. W., Breckenridge, R. T., J. Lab. Clin. Med. 65, 307 (1965)

211) Eisen, V., Keele, C. A., in: Hypotensive peptides, p. 551, ed. by E. G. Erdös, N. Back and F. Sicuteri. Berlin - Heidelberg - New York: Springer 1966

212) Ratnoff, O. D., Crum, J. D., J. Lab. Clin. Med. 63, 359 (1964)

213) Del Bianco, P. L., Fanciullacci, M., Franchi, G., in: Adv. Exp. Med. Biol., Vol. 21, p. 453, ed. by N. Back and F. Sicuteri. New York: Plenum Press 1972

214) Neumayr, A., Peschl, L., Rettenbacher-Teubner, H., Wr. Klin. Wochenschrift 80, 778 (1968)

215) Tella, A., Maegraith, B. G., Ann. trop. Med. Parasit. 60, 304 (1966)

216) Onabanjo, A. O., Maegraith, B. G., Br. J. exp. Path. 51, 523 (1970)

217) Ohtomo, H., Katori, M., Japan. J. Pharmacol. 22, 493 (1972)

218) Aaron, R. K., Life Sci. 16, 827 (1975)

219) Sumi, H., Fujii, S., J. Biochem. 75, 253 (1974)

220) Gecse, A., Life Sci. 16, 823 (1975)

221) Kallen, R. J., Lee, S. K., Pediat. Res. 9, 705 (1975)

222) Zeitlin, I. J., Sharma, J. N., Brooks, P. M., Dick, W. C., in: Adv. Exp. Med. Biol., Vol. 70, p. 335, ed. by F. Sicuteri, N. Back and G. L. Haberland. New York: Plenum Press 1976

223) Zeitlin, I. J., Smith, A. N., Gut 14, 133 (1973)

224) Herxheimer, H., Stresemann, E., Arch. int. Pharmacodyn. Thér. 144, 315 (1963)

225) Abe, K., Watanate, N., Kumagai, N., Mouri, T., Seki, T., Yoshinaga, K., Experientia 23, 626 (1967)

226) Lukjan, H., Hafman, J., Kiersnowska, B., Bielawiec, M., Chyrek-Borowska, S., Allerg. Immunol. (Leipz.) 18, 25 (1972)

227) Newball, H. H., Med. Ann. DC 43, 111 (1974)

228) Beraldo, W. T., Am. J. Physiol. 163, 283 (1950)

229) Rocha E Silva, M., Holzhacker, E. L., Arch. int. Pharmacodyn. 122, 168 (1959)

230) Webster, M. E., Clark, W. R., Am. J. Physiol. 197, 406 (1959)

231) Meyer, A., in: Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, S. 142, hrsg. von R. Gross und G. Kroneberg. Stuttgart: Schattauer 1966

232) Starr, M. S., West, G. B., J. Pharm. Pharmacol. 19, 547 (1967)

233) Urbanitz, D., Sailer, F., Habermann, E., in: Adv. Exp. Med. Biol., Vol. 8, p. 343, ed. by F. Sicuteri, M. Rocha E Silva and N. Back. New York: Plenum Press 1970

234) Zacherl, G., Dissertation Med. Fakultät, Univ. München 1975

235) Werle, E., in: Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, S. 176, hrsg. von R. Gross und G. Kroneberg. Stuttgart: Schattauer 1966

236) Nagel, M., Karl-Schuch, W., Rahmanzadah, R., in: Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, S. 129, hrsg. von R. Marx, H. Imdahl und G. L. Haberland. Stuttgart - New York: Schattauer 1968

237) Sicuteri, F., Del Bianco, P. L., Fanciulacci, M., in: Adv. Exp. Med. Biol., Vol. 9, p. 315, ed. by A. Bertelli and N. Back. New York: Plenum Press 1970

238) Wiegershausen, B., Henninghausen, G., Klausch, B., Korber, H. G., Hauzeur, F., in: Adv. Exp. Med. Biol., Vol. 8, p. 221, ed. by F. Sicuteri, M. Rocha E Silva and N. Back. New York: Plenum Press 1970

239) Gomazkov, O. A., in: Ischämie, S. 101, hrsg. von D. Gross, E. Habermann, W. Kübler, E. Lindner, R. Rau, W. Rotter, W. Schweizer, Y. Zottermann. Stuttgart - New York: Schattauer 1975

240) Massion, W. H., Blümel, G., Peschl, L., in: Proc. Int. Symp. "Proteases and Antiproteases in Cardioangiology", p. 81. Stuttgart - New York: Schattauer 1969

241) Greeff, K., Scharnagel, K., Lühr, R., Strobach, H., Naun.-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 253, 235 (1966)

242) Rothschild, A. M., Castania, A., J. Pharm. Pharmacol. 20, 77 (1968)

243) Werle, E., Naun.-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 245, 254 (1963)

244) Meyer, A., Werle, E., in: Pathogenese, Diagnostik, Klinik und Therapie der Erkrankungen des exokrinen Pankreas, S. 299, hrsg. von N. Henning, K. Heinkel und H. Schön. Stuttgart 1964

245) Meyer, A., Langenbecks Arch. klin. Chir. 313, 182 (1965)

246) Meyer, A., Habil.-Schr. Med. Fakultät, Univ. München 1964

247) Nies, A. S., Forsyth, R. P., Williams, H. E., Melmon, K. L., Circulat. Res. 22, 155 (1968)

248) Herman, C. M., Oshima, G., Erdös, E. G., J. Lab. Clin. Med. 84, 731 (1974)

249) Lecomte, J., C. R. Soc. Biol. (Paris) 155, 1411 (1961)

250) Lambert, P. H., Otto-Servais, M., Salmon, J., Lecomte, J., Int. Arch. Allergy 24, 27 (1964)

251) Cirstea, M., Suhaciu, G., Butculescu, I., Arch. Int. Pharmacodyn. 159, 18 (1966)

252) Brocklehurst, W. E., Lahiri, S. C., J. Physiol. 160, 15 (1962)

253) Brocklehurst, W. E., Lahiri, S. C., J. Physiol. 165, 39 (1963)

254) Back, N., Wilkens, H., Steger, R., Ann. N. Y. Acad. Sci. 146, 491 (1968)

255) Starr, M. S., West, G. B., Brit. J. Pharmacol. 37, 178 (1969)

256) Dawson, W., Starr, M. S., West, G. B., J. Physiol. 180, 14 (1965)

257) Ankier, S. I., Starr, M. S., Brit. J. Pharmacol. 31, 331 (1967)

258) Burdon, K. L., Queng, J. T., Thomas, O. C., Mc Govern, J. P., J. Allergy 36, 546 (1965)

259) Dollinger, M. R., Gardner, B., Surg. Gynec. Obstet. 122, 1335 (1966)

260) Oates, J. A., Melmon, K. L., in: Hypotensive peptides, p. 565, ed. by E. G. Erdös, N. Back and F. Sicuteri. Berlin - Heidelberg - New York: Springer 1966

261) Gardner, B., Dollinger, M., Silen, W., Back, N., OReilly, S., Surgery 61, 846 (1967)

262) Oates, J. A., Pettinger, W. A., Doctor, R. B., J. clin. Invest. 45, 173 (1966)

263) Zeitlin, I. J., Smith, A. N., Lancet 2, 986 (1966)

264) Werle, E., Trautschold, I., Schievelbein, H., Klin. Wschr. 44, 656 (1966)

265) Wong, P. Y., Talamo, R. C., Babior, B. M., Raymond, G. G., Colman, R. W., Ann. Int. Med. 80, 577 (1974)

266) Mac Donald, J. M., Webster, M. M. Jr., Tennyson, C. H., Am. J. Surg. 117, 204 (1969)

267) Sicuteri, F., Fanciullacci, M., Bavazzano, A., Franchi, G., Del Bianco, P. L., Angiolog. 21, 193 (1970)

268) Ostfield, A. M., Chapman, L. F., Goodell, H., Wolff, H. G., Psychosom. Med. 19, 199 (1957)

269) Chapman, L. F., Wolff, H. G., Sci. 128, 1208 (1958)

270) Periti, P., Sicuteri, F., Franchi, G., Michelacci, S., Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. 40, 951 (1964)

271) Colman, R. W., Mason, J. W., Sherry, S., Ann. Intern. Med. 71, 763 (1969)

272) Saito, H., Ratnoff, O. D., Waldmann, R., Abraham, J. P., J. Clin. Invest. 55, 1082 (1975)

273) Donaldson, V. H., Glueck, H. J., Miller, M. A., Movat, H. Z., Habal, F., J. Lab. Clin. Med. 87, 327 (1976)

274) Wupper, K. D., Miller, D. R., Lacombe, M. J., J. Clin. Invest. 56, 1663 (1975)

275) Colman, R. W., Bagdasarian, A., Talamo, R. C., Scott, C. F., Seavey, M., Guimaraes, J. A., Pierce, J. V., Kaplan, A. P., J. Clin. Invest. 56, 1650 (1975)

276) Greenbaum, L. M., Prakash, A., Semente, G., Johnston, M., Agents and Actions 3/5, 332 (1973)

277) Greenbaum, L. M., Grebow, P., Johnston, M., Prakash, A., Semente, G., Cancer Res. 35, 706 (1975)

278) Margolis, J. and E. A. Bishop, Nature (Lond.) 194, 749 (1962)

279) Margolis, J., Ann. N. Y. Acad. Sci. 104, 133 (1963)

280) Vogt, W., in: Hypotensive peptides, p. 185, ed. by E. G. Erdös, N. Back and F. Sicuteri. Berlin - Heidelberg - New York: Springer 1966

281) Vogt, W. und W. Wawretschek, Naun.-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 260, 223 (1968)

282) Eisen, V., J. Physiol. (Lond.) 186, 133 (1966)

283) Armstrong, D. and Mills, G. L., Biochem. Pharmac. 13, 1393 (1964)

284) Armstrong, D., Mills, G. L. and F. Sicuteri, in: Hypotensive peptides, p. 139, ed. by E. G. Erdös, N. Back and F. Sicuteri. Berlin - Heidelberg - New York: Springer 1966

285) Andrews, P., Biochem. J. 96, 595 (1965)

286) Rydén, L., Int. J. Prot. Res. 3, 191 (1971)

287) Roelcke, D., Z. Ges. Exp. Med. 148, 242 (1968)

288) Habermann, E., Jahrreis, R., Naun.-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 269, 101 (1971)

289) Bokisch, V. A. and H. J. Müller-Eberhard, J. clin. Invest. 49, 2427 (1970)

290) Schmid, K., in: Biochemistry of Glycoproteins and related Substances, Cystic Fibrosis, Part II, p. 4, ed. by E. Rossi and E. Stoll. Basel: Karger 1968

291) Dunstone, I. R., Sep. Sci. 4, 267 (1969)

292) Mac Farlane, R. G., Nature (Lond.) 202, 498 (1964)

293) Horton, E.W., J. Physiol. 170, 101 (1964)

294) Webster, M. E., in: Hypotensive peptides, p. 263, ed. by E. G. Erös, N. Back and F. Sicuteri. Berlin - Heidelberg - New York: Springer 1966

295) Hilton, S. M., Lewis, G. P., J. Physiol. 144, 532 (1958)

296) Carretero, O., Nasjletti, A., Fasciolo, J. C., Experientia 21, 141 (1965)

297) Trautschold, I., Rüdel, G., Klin. Wschr. 41, 297 (1963)

298) Effkemann, G., Werle, E., Arch. Gyn. 171, 1 (1941)

299) Berde, B., Saameli, K., Nature 191, 83 (1961)

300) Malofiejew, M., Clin. Sci. Mol. Med. 45, 429 (1973)

301) Melmon, K. L., Cline, M. J., J. Clin. Invest. 47, 1295 (1968)

302) Gautvik, K. M., Berg-Oestadvik, T., Nustad, K., Life Sci. 16, 813 (1975)

303) Moriwaki, C., Fujimori, H., Moriya, H., Life Sci. 16, 814 (1975)

304) Margolius, H. S., Geller, R., Pisano, J. J., Sjoerdsma, A., Lancet 2, 1063 (1971)

305) Croxatto, H. R., Corthorn, J., Roblero, J., Garcia, R., Albertini, R., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 147, 1 (1974)

306) Geller, R. G., Life Sci. 16, 815 (1975)

307) Croxatto, H. R., Roblero, J., Albertini, R., Corthorn, J., San Martin, M., Porcelli, G., Life Sci. 16, 815 (1975)

308) Margolius, H. S., Life Sci. 16, 816 (1975)

309) Keiser, H. R., Margolius, H. S., Pisano, J. J., Life Sci. 16, 817 (1975)

310) Werle, E., Korsten, H., Z. ges. exp. Med. 103, 153 (1938)

311) Grosu, L., Uza, G., Enesco, H., Angiol. 18, 23 (1966)

312) Adetuyibi, A., Mills, J. H., Lancet 2, 203 (1972)

313) Wong, P. Y., Talamo, R. C., Williams, G. H., Colman, R. W., J. Clin. Invest. 55, 691 (1975)

314) Ryan, J. W., Ryan, U. S., Life Sci. 16, 812 (1975)

315) Rothschild, A. M., Cordeiro, R. S. B., Castania, A., Naun.-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 282, 323 (1974)

316) Rothschild, A. M., Castania, A., Cordeiro, R. S. B., Naun.-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 285, 243 (1974)

317) Margolius, H. S., Horwitz, D., Geller, R.G., Alexander, R. W., Gill, J. R., Pisano, J. J., Keiser, H. R., Circ. Res. 35, 812 (1975)

318) Marin-Grez, M., Cottone, P., Carretero, O. A., Am. J. Physiol. 223, 794 (1972)

319) Mac Farlane, N. A. A., Ward, P. E., Life Sci. 16, 819 (1975)

320) Mills, I. H., Ward, P. E., J. Physiol. 246, 695 (1975)

321) Croxatto, H. R., Hudobro, F., Rojas, M., Roblero, J., Albertini, R., in: Adv. Exp. Med. Biol., Vol. 70, p. 361, ed. by F. Sicuteri, N. Back and G. L. Haberland. New York: Plenum Press 1976

322) Zaneveld, L. J. D., Dragoje, B. M., Schumacher, G. F. B., Science 177, 702 (1972)

323) Fritz, H., Förg-Brey, B., Fink, E., Meier, M., Schießler, H., Schirren, C., Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 353, 1943 (1972)

324) Fritz, H., Schießler, H., Schleuning, W.-D., Advanc. Biosci. 10, 271 (1973)

325) Kaplan, A. P., Schreiber, A. D., Austen, K. F., Fed. Proc. 31, 624 (1972)

326) Eisen, V., Loveday, C., Int. Arch. Allergy 45, 91 (1973)

327) Donaldson, V. H., J. Exp. Med. 127, 411 (1968)

328) Borges, D. R., Gordon, A. H., Life Sci. 16, 823 (1975)

329) Rocha E Silva, M., Rosenthal, S. R., J. Pharmacol. exp. Ther. 132, 110 (1961)

330) Rocha E Silva, M., Biochem. Pharmacol. 10, 3 (1962)

331) Bonta, I. L., De Vos, C. J., III rd International Pharmacological Congress, Sao Paulo 1966, Abstracts.

332) Kaller, H., in: Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, S. 152, hrsg. von R. Gross und G. Kroneberg. Stuttgart: Schattauer 1966

333) Garcia Leme, J., Hamamura, L., Rocha E Silva, M., Brit. J. Pharmacol. 40, 294 (1970)

334) Starr, M. S., West, G. B., Br. J. Pharmac. Chemother. 31, 178 (1967)

335) Urbanitz, D., Wiegand, H., Habermann, E., Naun.-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 264, 476 (1969)

336) Edery, H., Lewis, G. P., J. Physiol. 169, 568 (1963)

337) Jacobsen, S. and B. A. Waaler, Brit. J. Pharmacol. 27, 222 (1966)

338) Van Arman, C. G., Life Sci. 16, 822 (1975)

339) Rocha E Silva, M., Ann. N. Y. Acad. Sci. 116, 899 (1964)

340) Lykke, A. W. J., Willoughby, D. A., Kosche, E. R., J. Path. Bact. 94, 381 (1967)

341) Cummings, R., Lykke, A. W. J., Br. J. exp. Path. 51, 19 (1970)

342) Cummings, R., Lykke, A. W. J., Pathology 5, 117 (1973)

343) Movat, H. Z., Steinberg, S. G., Habal, F. M. und Ranadive, N. S., Agents and Actions 3/5, 284 (1973)

344) Melmon, K. L., Cline, M. J., Nature 213, 90 (1967)

345) Greenbaum, L. M., Kim, K. S., Br. J. Pharmac. 29, 238 (1967)

346) Greenbaum, L. M., Yamafuji, K., Life Sci. 4, 657 (1965)

347) Greenbaum, L. M., Yamafuji, K., in: Hypotensive peptides, p. 252, ed. by N. Back and F. Sicuteri. Berlin - Heidelberg - New York: Springer 1966

348) Greenbaum, L. M., Yamafuji, K., Br. J. Pharmacol. 27, 230 (1966)

349) Carvalho, J. F., Diniz, C. R., Ann. N. Y. Acad. Sci. 116, 912 (1964)

350) Yamafuji, K., Takeishi, M., Life Sci. 16, 822 (1975)

351) Goetzl, E. J., Schreiber, A. D., Austen, K. F., Life Sci. 16, 820 (1975)

352) Ludany, G., Vajda, J., Bertha, I., Naturwissenschaften 54, 51 (1967)

353) Wilhelm, D. L., Agents and Actions 3/5, 297 (1973)

354) Bazin, S., Pelletier, M., Delaunay, A., Agents and Actions 3/5, 317 (1973)

355) Trapnell, J. E., Life Sci. 16, 830 (1975)

356) Berry, H. E., Collier, I. G., Vane, I. R., Clin. Sci. 39, 349 (1970)

357) Kimball, H. R., Melmon, K. L., Wolff, S. M., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 139, 1078 (1972)

358) Reichgott, M. J., Forsyth, R.P., Greineder, D. K., Melmon, K. L., Circ. Res. 33, 346 (1973)

359) Attar, S. M. A., Tingey, H. B., Mc Laughlin, I. S., Cowley, R. A., Surg. Forum 18, 46 (1967)

360) Stock, W., Eigler, F. W., Z. ges. exp. Med. 151, 64 (1969)

361) Ludwig, H., Tauber, P., in: Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, S. 125, hrsg. von G. L. Haberland, P. Huber und P. Matis. Stuttgart: Schattauer 1970

362) Hess, A., Ringeling, M., Hering, J., Schmitt, W., Steyer, M., Willebrand, J., Scheibe, O., Chirurg. 42, 317 (1971)

363) Kilian, J., Dölp, R., Reineke, H., Ahnefeld, F. W., Wolf, G. K., in: Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, S. 45, hrsg. von W. Brendel und G. L. Haberland. Stuttgart: Schattauer 1972

364) Glenn, T. M., Lefer, A. M., in: Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, S. 55, hrsg. von W. Brendel und G. L. Haberland. Stuttgart: Schattauer 1972

365) Sicuteri, R., Franchi, G., Del Bianco, P. L., Del Bene, E., Mal. cardiovasc. 8, 3 (1967)

366) Massion, W. H., Blümel, G., Peschl, L., in: Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, S. 75, hrsg. von W. Brendel und G. L. Haberland. Stuttgart: Schattauer 1972

367) Werle, E., in: Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, S. 177, hrsg. von R. Gross und G. Kroneberg. Stuttgart: Schattauer 1966

368) Miller, R. L., Reichgott, M. J., Melmon, K. L., J. Infect. Dis. 128, 144 (1973)

369) Miller, R. L., Webster, M. E., Melmon, K. L., Europ. J. Pharm. 33, 53 (1975)

370) Spragg, J., Kaplan, A. P., Austen, K. F., Ann. N. Y. Acad. Sci. 209, 372 (1973)

371) Katori, M., Life Sci. 16, 829 (1975)

# LEBENSLAUF

Am 18. September 1944 wurde ich als drittes Kind meiner Eltern Walter Dieterle und Gertrud Dieterle, geb. Bäuerle, in Göppingen geboren.
Hier besuchte ich die Grundschule und anschließend das Mörike-Gymnasium, an dem ich im März 1964 die Reifeprüfung bestand.
Nach einem halbjährigen Praktikum in der Deutschen Verlags-Anstalt in Stuttgart begann ich im Wintersemester 1964/65 an der Universität München das Studium der Zeitungswissenschaft, Politischen Wissenschaften und Germanistik.
Im Wintersemester 1965/66 wechselte ich zum Studium der Medizin über, ebenfalls an der Universität München. Dort legte ich 1968 das Physikum und 1971 das Staatsexamen ab.

Als Medizinalassistentin war ich in der II. Med. Klinik der Universität München, in der Chirurgischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses München-Oberföhring, in der I. Med. Klinik der Technischen Universität München und im Institut für Chirurgische Forschung der Universität München tätig. An diesem Institut war ich im Anschluß an die Medizinalassistentenzeit bis September 1973 als wissenschaftliche Assistentin beschäftigt. Ab 1974 arbeitete ich als praktische Ärztin in verschiedenen Allgemeinpraxen in Bayern. Im Frühjahr 1976 begann ich mit der vorliegenden Arbeit.